

CYNTHIA HELENA MERLIN

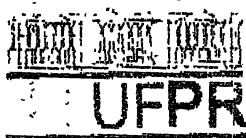
**Presença de PrPc e seu ligante STI1 em plaquetas
e micropartículas humanas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2005



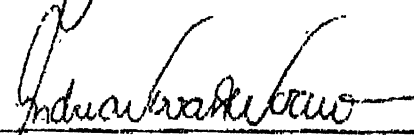
Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SETOR DA SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

ATA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos dezenove dias do mês de outubro de dois mil e cinco, às quatorze horas, na sala 129 do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora para defesa pública da dissertação de Mestrado de autoria da Pós-Graduanda em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Cynthia Helena Merlin, intitulada "Presença de PrPc e seu ligante STII em plaquetas e micropartículas humanas", sob a orientação do Prof. Dr. Silvio Marques Zanata e a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr. Silvio Marques Zanata (Departamento de Patologia Básica/UFPR) presidente, Dr^a. Andréa Novais Moreno (CCBS/ PUC-PR), Dr^a. Lia Sumie Nakao (Centro de Investigação Moléculas Avançada/ PUC-PR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos tendo a candidata 60 (sessenta) minutos para expor oralmente seu trabalho. Em seguida foi arguida durante 30 (trinta) minutos por cada um dos membros da Banca Examinadora, e tendo 30 (trinta) minutos para responder a cada uma das arguições. No final a candidata foi APROVADA, segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação. Para a devida publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 19 de Outubro de 2005.



Prof. Dr. Silvio Marques Zanata (presidente)



Prof. Dr^a Andréa Novais Moreno



Prof^a Dr^a Lia Sumie Nakao

**"Deus nos faz perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança."**

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao **Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia** da Universidade Federal do Paraná, pela excelência de trabalho organizacional e operacional. Especialmente à **Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol**, pela coordenação, pulso e impulso que desprende ao Curso de Pós-Graduação a cada dia seu de trabalho.

Ao **Departamento de Patologia Básica**, por sediar o Programa da Pós-Graduação e ao **Departamento de Biologia Celular**, por ceder espaço físico no cultivo celular.

À **Dra. Vilma Regina Martins**, pelo apoio intelectual e financeiro.

Às instituições **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Temático de Prions)/FAPESP**, além do **CNPq** e **CAPES-PROF**, pelo suporte financeiro.

À **Dr.^a Anamaria Aranha Camargo**, Ludwig Insitute for Cancer Research - São Paulo, por ceder, gentilmente, a linhagem A171 (glioblastoma humano) para o cultivo celular.

Ao **Prof. Dr. Silvio Marques Zanata**, pelo apoio e oportunidade que me proporcionou ao me orientar neste trabalho, especialmente pela sua amizade e companheirismo.

À sua esposa, **Prof.^a Dr.^a Lia Sumie Nakao**, pela ajuda direta e indireta na execução deste trabalho.

Aos **colegas do Laboratório de Neurobiologia** do Departamento de Patologia Básica e do **Laboratório de Biotecnologia de Venenos e Matriz Extracelular** do Departamento de Biologia Celular, pela ajuda na execução do projeto.

À todos os **colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação**, pela atenção, união e companheirismo durante todo o tempo em que estivemos juntos.

Especialmente a “minha guru”, minha orientadora nos cursos de extensão, estágios e tudo mais onde tive a chance de extrair o máximo dela, melhor professora e amiga, **Prof.^a Dr.^a Ida Cristina Gubert**, pela pessoa e valores que me ensina a cada dia de minha vida, e também pela leitura e correção da minha dissertação.

Ao **Prof. Dr. Luis Felipe Caron**, meu especial amigo e colega de trabalho, lição e exemplo de vida para qualquer pessoa, pela sua alegria contagiante e incentivo durante toda a execução do projeto.

À **Prof.^a Dra.^a Célia Regina Cavichiolo Franco**, pelas correções realizadas no início dadas para este trabalho.

À **Juliana Zanetti Ribeiro**, pela sua amizade que tem demonstrado ao longo de todos estes anos, paciência e dedicação ao me orientar na escrita da dissertação.

Ao **Aldo Gennari**, meu namorado, especialmente pela paciência e carinho.

Aos meus pais, **Regina Célia e Alceu Merlin**, por serem meus alicerces, por terem me dado oportunidades para alcançar meus objetivos, pelo carinho, amizade e amor.

À **Donninha e ao Schwann**, meus filhotes, por sempre me ensinarem o que é o amor incondicional.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doenças neurodegenerativas envolvendo prions em humanos.....	1
1.2 Características morfológicas da doença neurodegenerativa.....	4
1.3 Prions	5
1.4 Propriedades do PrPc / PrPsc	7
1.5 Função normal do PrPc	9
1.6 Proteínas ligantes do PrPc	10
1.7 A função normal do PrPc	11
1.8 PrPc e STI1	11
1.9 Ativação e agregação plaquetária	14
1.10 Micropartículas	16
1.11 Formação e características das micropartículas	17
1.12 Micropartículas em situações patológicas	18
1.13 Efeitos biológicos de micropartículas	19
1.14 PrPc e plaquetas	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Materiais	23
3.2 Linhagem celular	23

3.3 Preparação da fração protéica de 55% (fração 55%) de sulfato de amônio e de membrana plasmática de cérebro de camundongos (MARTINS et al., 1997)	23
3.4 Preparação de extratos celulares	24
3.5 Preparação de <i>Western blotting</i> (ZANATA et al., 2002 a,b)	24
3.6 Obtenção de micropartículas de plaquetas por ativação com ionóforo de cálcio e trombina	25
3.7 Obtenção de lisado de plaquetas	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

A proteína prion celular (PrPc) é uma molécula de ocorrência natural em indivíduos normais e que, devido a mudança conformacional anormal acaba por causar doenças neurodegenerativas em humanos e animais. A forma anormal do PrPc é denominada proteína prion *scrapie* (PrPsc) e é o principal, se não o único, constituinte dos prions. Embora a literatura tenha enfatizado o estudo do PrPsc e o mecanismo de propagação das doenças priônicas, pouco tem sido feito para o entendimento do papel fisiológico do PrPc. Em 2000 nosso grupo caracterizou um ligante para o PrPc utilizando o princípio da hidropaticidade complementar como sendo a STI-1 (Stress Inducible Protein-1). Paralelamente, mostramos que o PrPc se liga ao domínio RNIAEIIKDI da laminina (Ln), agindo como um receptor para esta molécula da matriz extracelular. Aparentemente tanto o PrPc como STI1 possuem expressão ubíqua, tendo sido descrita a presença de PrPc em vários tipos celulares (neurônios, linfócitos, plaquetas) e seus micro-domínios (membrana plasmática, retículo endoplasmático e núcleo). Durante a ativação plaquetária são observadas diversas alterações morfológicas e bioquímicas que incluem aumento na expressão extracelular de vários receptores associados a adesão celular bem como a liberação de micropartículas. Micropartículas são pequenas vesículas (geralmente $<1\mu\text{m}$ diâmetro), liberadas da membrana plasmática de células ativadas ou apoptóticas. Já foram descritas micropartículas derivadas de vários tipos celulares, como leucócitos, células vasculares, plaquetas e hepatócitos. Os efeitos biológicos das micropartículas tem sido estabelecidos e incluem propriedades pró-coagulante, pró-inflamatório e pró-apoptótico. Neste trabalho confirmamos dados da literatura que evidenciam a presença de PrPc em plaquetas humanas ativadas. Pela primeira vez é demonstrada a presença do proteína STI1, tanto em plaquetas como em micropartículas. Não sabemos ainda qual é o significado biológica da presença destas duas moléculas em plaquetas, entretanto o pareamento de expressão nos mesmos compartimentos plaquetários sugere que atuem de forma coordenada na função plaquetária de manutenção da hemostasia corpórea.

ABSTRACT

Conversion of the cellular prion protein (PrP^c) to its abnormal isoform PrP^{sc} is associated with some neurodegenerative and fatal diseases called prion diseases. Although the literature has been emphasizing the mechanism of PrP^{sc} conversion and illness propagation, little attention has been given to the PrP^c physiological role. In 2000, our group identified a PrP^c ligand based on the complementary hydropathy theory as STI-1, the Stress Inducible Protein-1. In parallel, we demonstrated that PrP^c interacts with RNIAEIIKDI domain of laminin (Ln) inducing cell adhesion and neurite outgrowth. Apparently both PrP^c and STI1 have ubiquitous expression and PrP^c presence was reported on several cell types including neurons, lymphocytes and platelets. During platelet activation some morphological and biochemical changes are observed and include increased cell adhesion molecules expression and microparticles shedding. Microparticles are small vesicles, produced during cell activation or apoptosis. They can be derived from several cell types, such as leukocytes, vascular cells, platelets and hepatocytes. The biological effects of microparticles have not been well defined, however some roles have been suggested and include pro-coagulant, pro-inflammatory and pro-apoptotic properties. Herein we confirmed PrP^c expression on activated platelets. For the first time we demonstrated a STI1 presence both in platelets and platelet microparticles. The biological significance and role of both molecules on platelets and microparticles have not been elucidated, but these data suggest a role on platelet function during human body hemostasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anticorpos anti-rPrPc reconhece PrPc presente no Sistema Nervoso Central e heterologamente expresso em bactérias.....	28
Figura 2. Anticorpos anti-rSTI1 reconhece STI1 presente no Sistema Nervoso Central de camundongos e humanos e heterologamente expresso em bactérias.....	30
Figura 3. PrPc está presente em plaquetas humanas.....	33
Figura 4. Formas multiméricas de PrPc estão presentes no Sistema Nervoso Central de camundongos e em plaquetas.....	33
Figura 5. STI1 está presente em plaquetas humanas.....	34
Figura 6. PrPc não foi detectado em micropartículas de plaquetas humanas.....	36
Figura 7. STI1 está presente em micropartículas humanas.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μg -Microgramas

μL -Microlitros

A172 - Glioblastoma de origem humana

APP -Proteína precursora amilóide

BSA - Albumina sérica bovina

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA - Etilenodiamino tetraacetato

GAP - Proteína associada ao crescimento

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

IgG - Imunoglobulina do tipo G

KCl - Cloreto de potássio

KDa - Quilodáton

KH_2PO_4 - Fosfato de potássio monobásico

Ln - Laminina

MEC/ ECM - Matriz extracelular

MEM - Minimum Essential Medium

mL - Mililitros

mM -Milimolar

Na_2HPO_4 - Fosfato de sódio bibásico anidro

NaCl - Cloreto de sódio

$\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ - Sulfato de amônio

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PrPc - Proteína prion celular

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SOD – Superoxido mutase

TBST - Solução salina de Tris com Tween 20

TEMED - Tetrametil etilenodiamina

TNF - Fator de necrose tumoral

Tris - Tris (hidroximetil) amino metano

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças neurodegenerativas envolvendo prions em humanos

Durante os últimos anos, patógenos responsáveis por doenças neurodegenerativas têm sido caracterizados e se mostrado diferentes dos então conhecidos viróides e vírus. A infecção descrita até então como *scrapie* se mostrou dependente de um componente protéico que foi denominado de **prion** (PRUSINER et al., 1998; PRUSINER, 1997).

As doenças priônicas incluem as encefalopatias espongiformes transmissíveis de gado, carneiros, felinos, ungulados e de alguns animais selvagens (PRUSINER et al., 1998; PRUSINER, 1997). Em humanos a forma Kuru foi descrita em nativos de Papua - Nova Guiné, relatada por Vicent Zigas e Carlon Gajdusek em 1957, que mantinham a tradição de ingerir vísceras de antepassados mortos (GAJDUSEK, 1977). A doença foi exterminada pela interrupção da prática canibal. Além desta, a doença de Cretzfeldt-Jakob (CJD), bastante rara (um afetado em um milhão de indivíduos) e de distribuição mundial, a síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e a Insônia Familiar Fatal (FFI) também atingem a espécie humana (PRUSINER, 1993).

A forma Kuru tem um período de incubação que pode variar de 2 a 23 anos, e três estados de progressão dos sintomas podem ser delineados. Os primeiros sinais do denominado estado ambulatorial consiste de uma instabilidade postural, do modo de andar, voz, mãos e olhos; deterioração da linguagem, tremores e disartria. O segundo estágio, denominado de estágio sedentário, caracteriza-se por incapacidade do doente em andar sem uso de suporte, tremores mais intensos e severos, ataxia, movimentos bruscos e repentinos, ataques de riso efusivo, depressões, raciocínio lento. Nesta fase, ainda não ocorre degeneração muscular e os reflexos ao nível dos tendões são ainda normais. O terceiro estágio é a fase terminal, sendo marcado pela incapacidade do paciente em se manter em pé sem auxílio de suporte, intensificação da ataxia, tremores, incontinência urinária e fecal, disfagia e aparecimento de ulcerações profundas.

A CJD é a doença mais comum na população humana, apesar do baixo índice citado. Sabe-se que 10 a 15% dos casos são hereditários e uma porcentagem é devida à contaminação decorrente de tratamento médico. Nestes casos, a doença pode ocorrer na adolescência ou juventude, tendo um período de incubação mais curto de 4 a 10 anos.

A GSS é uma doença que afeta unicamente o homem e é cerca de 10 a 20 vezes menos freqüente que a CJD. Manifesta-se entre a 4.^a e 5.^a década de vida do ser humano e caracteriza-se por perda de equilíbrio, manifestação de movimentos frenéticos e involuntários e problemas ordem motora.

A FFI é uma doença genética e hereditária. Contudo, a doença pode ocorrer espontaneamente – insônia fatal esporádica ou sFI. Estes dois tipos de doença diferem das restantes doenças priônicas pelo fato de fFI e sFI afetarem predominantemente o tálamo – órgão influente do sono. A doença inicia-se, predominantemente, entre 40 e 60 anos, mas pode iniciar-se aos 30 anos, também. No início, as pessoas podem ter menos dificuldade em dormir e, ocasionalmente, apresentam alguns problemas musculares, mas, com o passar dos anos, acabam por perder a apetência para o sono. Outros sintomas associados são súbitas contrações musculares, ritmo cardíaco acelerado, fala anormal, tremores, movimentos frenéticos involuntários e demência progressiva. A morte acaba por ocorrer ao fim de 7 a 36 meses da doença (OKAMOTO, 2004).

Três características microscópicas caracterizam este grupo de doenças, degeneração espongiiforme dos neurônios com o aparecimento de um grande número de vacúolos, astrogliose e formação de placas amilóides (BRUCE e FRASER, 1975; BECK; DANIEL; PARRY, 1964).

Os sinais clínicos são bastante variáveis. Os pacientes de Kuru apresentam sinais de disfunção cerebelar, perda de memória e desorientação acompanhada por reflexos primitivos na fase final da doença (PRUSINER; GAJDUSEK; ALPERS, 1982). Esta observação contrasta com a vista em portadores de CJD que apresentavam sinais de demência precocemente e perda de coordenação motora (ROOS; GAJDUSEK; GIBBS, 1973). Sua etiologia é desconhecida nas formas esporádicas da doença - 85-

90% dos casos. Os pacientes com GSS apresentam ataxia cerebelar, com reflexos diminuídos ou ausentes nas extremidades inferiores, podendo ou não apresentar demência (PRUSINER, 1993).

As manifestações das doenças priônicas em humanos podem ter três causas: infecciosas, esporádicas e hereditárias. O Kuru foi espalhado exclusivamente através de rituais canibalísticos (GAJDUSEK, 1977). Alguns casos de CJD foram descritos em pacientes que sofreram algum tipo de procedimentos médicos, como aplicação de eletrodos cerebrais, transplante de retina, prótese de dura-máter e uso de hormônio de crescimento purificado a partir de pituitária de cadáveres, todos contaminados com o agente infeccioso de indivíduos portadores da doença (BROWN, 1980).

Um aspecto surpreendente é o padrão hereditário encontrado em cerca de 10% dos casos de CJD, mostrando um novo e interessante aspecto destas patologias (MASTERS; GAJDUSEK; GIBBS JUNIOR, 1981a; GAJDUSEK, 1977). Pela primeira vez era descrita uma disfunção que possuía um padrão simultaneamente infeccioso e hereditário. O componente hereditário das patologias como GSS e FFI é muito maior que infeccioso, sendo responsável por mais de 90% dos casos, exibindo um padrão autossômico dominante com penetrância completa (MASTERS; GAJDUSEK; GIBBS JUNIOR, 1981b). Mutações somáticas no gene prion podem ser incluídas como causa principal das manifestações esporádicas (PRUSINER, 1991).

Outra doença neurodegenerativa, que tem desencadeado intensas pesquisas nas últimas duas décadas é a doença de Alzheimer. Esta doença vem se tornando um problema de saúde pública já que a expectativa de vida da população mundial tem aumentado e esta doença, atualmente, não é curável ou passível de prevenção. Aproximadamente 10% dos indivíduos na faixa dos sessenta anos e 25% na faixa dos oitenta anos possuem sintomas da doença de Alzheimer (BUSH; TANZI, 1997).

Várias características aproximam estas duas neuropatologias tanto sob o aspecto clínico como as propriedades morfológicas dos órgãos afetados bem como dos agentes que provocam as doenças. Do ponto de vista clínico, tanto os pacientes com doença de Alzheimer quanto os pacientes com doenças priônicas sofrem, inicialmente, de demência. Este quadro evolui até comprometimento das funções motoras e morte.

A apresentação dos primeiros sinais clínicos pode variar muito dependendo do tipo de doença priônica e como foi adquirida. Na doença de Alzheimer, os primeiros sinais clínicos se manifestam por volta dos setenta anos, enquanto em algumas doenças causadas por prions, como CJD, por exemplo, o quadro é normalmente observado mais precocemente, com o paciente apresentando cinquenta anos. (HSIAO, 1997).

Do ponto de vista histopatológico, ambas as doenças podem apresentar placas amilóides - em Alzheimer ocorre deposição de fragmento β -amilóide e em doenças priônicas, eventualmente, deposição de PrPsc.

1.2 Características morfológicas da doença neurodegenerativa

As doenças priônicas caracterizam-se por apresentarem uma variedade de fenótipos com apresentações clínicas distintas. Assim, as doenças priônicas nos animais e nos humanos podem ser divididas em três grandes categorias baseadas nas características neuroanatômicas e nas propriedades da proteína patogênica PrP no cérebro.

A primeira categoria inclui o *scrapie* das ovelhas e das cabras; BSE; Kuru; Doença de Creutzfeldt-Jakob - esporádica (sCJD), familiar (fCJD) e iatrogênica (iCJD); e insônia fatal familiar (fFI) e esporádica (sFI).

Esta categoria é caracterizada por degenerescência vacuolar (espongiforme) da substância cinzenta, acumulação da PrPsc resistente à protease, neurópilos da substância cinzenta e pouca ou nenhuma formação de placas amilóides de PrP. A vacuolização do citoplasma neuronal resulta na aparência esponjosa típica do parênquima cerebral.

As únicas doenças incluídas na segunda categoria são as sete síndromes predominantemente hereditárias designadas por GSS. A característica neuropatológica definitiva é a deposição de numerosas placas amilóides com imunopositividade para a PrP em múltiplas regiões cerebrais corticais e sub-corticais que são compostas por peptídeos PrP altamente truncados com tamanho de 90 a 160 resíduos. Estes peptídeos são amiloidogênicos e, quando libertados no espaço extracelular,

polimerizam num grande número de placas amilóides. A maioria das mutações relacionadas com as mudanças neuropatológicas das GSS ocorre neste domínio. Ao contrário da PrP acumulada na substância cinzenta na fCJD, que é resistente à protease, totalmente mutada (designada PrP), esta é sensível à protease. Da mesma forma, a PrP na substância cinzenta de modelos de ratos transgênicos de GSS é sensível à protease.

A terceira categoria de doenças priônicas humanas é representada pela nova variante de CJD, designada nvCJD. Tal como a GSS, existe uma abundante deposição amilóide de PrP e, tal como a CJD e *scrapie*, ocorre uma intensa vacuolização da substância cinzenta e acumulação da protease resistente PrP^{Sc} nos neurópilos; contudo, ao contrário da GSS, não foi identificada mutação PRNP.

1.3 Prions

O conhecimento do agente infeccioso e dos mecanismos patológicos envolvidos com as encefalopatias espongiformes foi possível a partir da transmissão do *scrapie* de ovelhas para animais de laboratório, permitindo uma redução drástica no tempo de incubação da doença - de anos para meses (revisado por PRUSINER et al., 1998).

No início dos anos 80, dois trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa de Stanley Prusiner descreveram o isolamento da partícula infecciosa dos cérebros de animais de laboratório experimentalmente infectados com *scrapie*. O protocolo de purificação consistia de extrações com detergentes, proteólise limitada, centrifugação diferencial e sedimentação através de gradiente descontínuo de sacarose. O material obtido mostrou-se extremamente insolúvel, com características tintoriais semelhantes a depósitos amilóides (coloração pelo vermelho Congo e birrefringência sob microscopia de luz polarizada). Em microscopia eletrônica de transmissão, o agente infeccioso purificado apresentou-se como pequenos agregados de estruturas alongadas, com tamanho e formato irregulares. Ao se empregar o mesmo protocolo de purificação, material semelhante foi extraído do cérebro de pacientes diagnosticados como portadores de CJD, sob o aspecto bioquímico e microscópico (PRUSINER et al., 1982; PRUSINER et al., 1983).

Tais partículas foram, então, utilizadas na produção de anticorpos monoclonais, os quais, curiosamente, reconheceram uma proteína de 33-35KDa, presente tanto nos cérebros de animais doentes como de animais não infectados (OESCH; WESTAWAY; WÄLCHLI, 1985; BARRY et al., 1986). Com ajuda destes anticorpos, foi possível isolar uma proteína constituinte do agente infeccioso. A partir da análise química de uma pequena porção da amino terminal desta proteína, foi possível sintetizar peptídeos utilizados como antígeno na produção de anticorpos policlonais em coelhos. Tais anticorpos reagiram com a mesma proteína de 33-35 kDa (BARRY et al., 1986), sugerindo, assim, que a proteína presente nas partículas infecciosas do *scrapie* era um componente do cérebro de animais normais.

O termo prion - *proteinaceous infectious particle*, foi alcunhado em 1982 por Stanley Prusiner para salientar a natureza unicamente protéica das partículas infecciosas purificadas dos cérebros infectados. A proteína expressa constitutivamente no sistema nervoso central foi chamada de prion celular - PrPc, enquanto que a depositada no cérebro de animais infectados foi denominada de prion *scrapie* -PrPsc.

Após a digestão proteolítica do PrPsc, tem-se uma forma truncada, chamada de PrP₂₇₋₃₀ (OESCH; WESTAWAY; WÄLCHLI, 1985), enquanto que o mesmo tratamento aplicado ao PrPc leva a sua completa digestão.

O estudo das propriedades físico-químicas do PrPsc foi facilitado pela solubilização dos agregados de PrP₂₇₋₃₀, extraídos do cérebro de animais de laboratório portadores de *scrapie*, sem reduzir seu poder de infecção. Inicialmente, várias tentativas empregadas para a solubilização das partículas infecciosas, como o emprego de detergentes, de sais, alterações do pH e sonicação, foram infrutíferas (McKINLEY; BOLTON; PRUSINER, 1983; BOLTON; McKINLEY; PRUSINER, 1984). Entretanto, outros métodos, como desnaturação térmica, uso de detergentes desnaturantes como dodecil sulfato de sódio – SDS, fortes agentes caotrópicos e de ácidos e bases foram eficientes para a dissolução das partículas, diminuindo seu poder de infecção (revisado por PRUSINER, 1997).

Além disso, métodos físico-químicos que normalmente alteravam ácidos nucléicos, tais como radiação ultravioleta, ação de nucleases e dietil pirocarbonato não

desempenharam qualquer efeito sobre a capacidade infecciosa dos prions (PRUSINER, 1982).

Em 1982, S. Prusiner propôs que a partícula infecciosa prion era constituída, principalmente, se não puramente, de proteína. A idéia de um agente infeccioso completamente destituído de ácido nucléico representou um choque para a comunidade científica da época, pois sugeria uma séria profanação ao dogma central da biologia molecular, que estabelece um fluxo de informação genética partindo do ácido nucléico para proteína e não o inverso (KEYES, 1999).

1.4 Propriedades do PrPc/PrPsc

Como foi citado anteriormente, o uso de métodos bioquímicos permitiu a co-purificação de uma única proteína de 27-30kDa que é responsável pela capacidade infectiva do prion (McKINLEY; BOLTON; PRUSINER, 1983), sendo esta derivada de uma proteína maior de 33-35kDa designada de prion *scrapie* ou PrPsc (MEYER; McKINLEY; BOWMAN, 1986). Estudos subseqüentes mostraram que cérebros de animais não infectados apresentavam uma forma similar da proteína que foi denominada PrPc (OESCH; WESTAWAY; WÄLCHLI, 1985). Determinou-se, então, que PrPsc é uma isoforma anormal, modificada pós-traducionalmente, de PrPc, sendo que ambas proteínas são ligadas à membrana celular por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol - GPI (OESCH; WESTAWAY; WÄLCHLI, 1985). Enquanto que a seqüência primária de ambas as proteínas é a mesma, sua estrutura secundária difere acentuadamente, sendo que o PrPc é constituído predominantemente por α -hélice - 42%, enquanto que o PrPsc é rico em regiões contendo folhas β -pregueada - 43%, principal característica das moléculas infecciosas (PAN; STAHL; PRUSINER, 1992). Com o auxílio de peptídeos sintéticos, foi possível avaliar que as α -hélices poderiam ser convertidas em estruturas β -pregueadas (GASSET et al., 1992) e que estas poderiam induzir mudanças conformacionais em peptídeos com estrutura helicoidal (NGUYEN et al., 1995). Paralelamente, foi mostrada a conversão do PrPc em PrPsc *in vitro* (KOCISKO et al., 1994), sendo a proteína resultante de tal conversão rica em

estruturas β -pregueadas, o que explicaria a deposição tóxica de agregados insolúveis nos tecidos cerebrais (KAKIZUKA, 1998).

A proteína PrPc é codificada a partir de uma sequência aberta de leitura localizada em um único exon tanto em camundongos e ratos como em humanos (PRUSINER, 1997). O mRNA do PrPc pode ser detectado no tubo neural de camundongos a partir do décimo terceiro dia de vida intra-uterina, sendo sua quantidade aumentada após o nascimento (MANSON et al., 1992).

Além da adição da âncora de GPI, outra modificação pós-traducional marcante nas duas isoformas é a de possuírem carboidratos ligados à cadeia polipeptídica (ROGERS et al., 1990).

Outra propriedade do PrPc é a capacidade desta molécula de ligar íons Cu^{2+} com afinidade da ordem de 10^{-11} M através de quatro histidinas contidas em cinco ou seis regiões repetidas, de oito aminoácidos cada, localizada na região amino terminal (HORNSHAW et al., 1995; BROWN et al., 1997, VILES et al., 1999).

A proteína PrPc cicla constitutivamente entre a superfície celular e um compartimento intracelular (TARABOULOS et al., 1992). Usando microscopia eletrônica e análise bioquímica, observou-se que, em cultura de neuroblastomas e de neurônios, o PrPc está presente em vesículas revestidas por clatrina, que participam da sua internalização (SHYNG; HEUSER; HERRIS, 1994). Esta via de endocitose colocou uma questão importante, já que a ausência de um domínio intracitoplasmático na molécula de PrPc impede sua interação direta com os adaptadores contidos nas vesículas revestidas de clatrina. Foi sugerido que o prion pudesse interagir com uma proteína transmembrânica que contivesse o sinal de internalização (SHYNG et al., 1995); porém, a internalização por caveola (VEY et al., 1996) e a existência de uma isoforma transmembrânica de PrPc (HEDGE et al., 1998) sugerem um mecanismo mais complexo de tráfego protéico pois ambas as vias podem ser utilizadas simultaneamente para internalização de proteínas (ANDERSON, 1993).

É sabido que existem regiões na estrutura primária da proteína de PrPc, resíduos 105 a 122 aminoácidos, que são críticos para sua internalização celular (SHYNG et al., 1995). Esta região da molécula é a mais conservada entre as espécies

(GABRIEL et al., 1992) e está entre os domínios que podem sofrer mudanças conformacionais secundárias de α hélice para folha β -pregueada - principal característica das moléculas infecciosas (GASSET et al., 1992).

Pesquisas recentes mostraram que o PrPsc se acumula em órgãos linfóides, tais como o baço, linfonodos e placas de Peyer, podendo ser disseminado para o restante do organismo. (BLÄTTLER et al., 1997, AGUZZI, 1997, LASMÉZAS et al., 1996). Esta disseminação poderia ser conduzida tanto pelo prion como auxiliada por moléculas ligantes de prion, as quais receberam muita atenção recentemente e serão discutidas a seguir (MARTINS et al., 1997, RIEGER et al., 1997, YEHIELY et al. 1997, EDENHOFER et al., 1996).

1.5 Função normal do PrPc

Estudos com animais nocautes para o gene do PrP (PrP^{-/-}) são controversos. O grupo de S. Sakagushi (SAKAGUSHI et al., 1996) mostrou que os animais possuem distúrbios motores dado, provavelmente, pela diminuição acentuada da camada de células de Purkinje no cerebelo. Enquanto que J. Collinge (COLLINGE et al., 1994) mostrou que os animais possuem resposta eletrofisiológica anormal no hipocampo, significando diminuição da LTP (*long term potentiation*). Esta medida está muito relacionada, em animais, com a memória a longo prazo. Outro grupo de pesquisa, de C. Weissmann (BÜELER et al., 1992), mostrou que os animais não possuem alteração significativa. Recentemente, foi descrito que animais PrP^{-/-} são mais sensíveis a drogas indutoras de distúrbios epiléticos (WALZ et al., 1999) e que possuem atividade locomotora alterada (ROESLER et al., 1999). Além disso, o grupo de C. Kuwahara (KUWAHARA et al., 1999) mostrou atividade apoptótica diferenciada em linhagens neuronais imortalizadas de animais PrP^{-/-}.

Com relação a propriedade do PrPc em ligar íons Cu^{2+} e possuir atividade semelhante a SOD (revisado por BROWN, 2001), sugere-se que o PrPc está tanto envolvido na homeostase deste íon metálico como na regulação antioxidante associada a SOD. De fato, em animais PrP^{-/-}, a quantidade do elemento cobre presente em preparações de membrana de cérebro é de dez a quinze vezes menor quando

comparada a animais selvagens (BROWN et al., 1997). Além disso, animais transgênicos com expressão aumentada de PrPc têm maior resistência ao estresse oxidativo enquanto neurônios de animais PrP^{-/-} são mais sensíveis a tal estresse (revisado por BROWN, 2001).

1.6 Proteínas ligantes de PrPc

A identificação de proteínas ligantes de PrPc poderia trazer pistas sobre sua função fisiológica, bem como na elaboração de um mecanismo envolvido na transmissão e progressão das doenças envolvendo prions. O PrPc possui uma série de características estruturais que são passíveis de permitir sua interação com outras proteínas. Dois potenciais sítios de interação são a presença de uma hélice anfipática próxima ao centro da molécula estando envolvida em interações proteína-proteína e a âncora de GPI, a qual pode ser internalizada e enviar sinais intracelulares.

Uma grande quantidade de moléculas possui a capacidade de associação com PrPc, ao menos *in vitro*, tais como heparina, chaperoninas HSP 60 e BiP, proteína acídica fibrilar glial (GFAP), apolipoproteína-1, o receptor de 37/66 kDa de laminina (revisado por MARTINS et al., 2001), distroglicana e algumas N-CAM's (*neural cell adhesion molecules*) são também ligantes de PrPc. Contudo, os argumentos para a relevância biológica para tais interações são pobres de consistência.

A presença de uma proteína receptora/ligante de PrPc que seja responsável por sua internalização, possível transdução de sinal e, ainda, pela entrada do agente PrPsc participando na infecção celular, tem sido bastante discutida na literatura (MARTINS; BRENTANI, 2002; MARTINS et al., 2002; MARTINS et al., 2001). Em 1997, o grupo de pesquisa de V.R. Martins descreveu uma proteína de 60-66 kDa que se liga ao PrPc e medeia a neurotoxicidade do peptídeo PrP₁₀₆₋₁₁₆ em cultura primária de neurônios (MARTINS et al., 1997).

Recentemente, a identidade de tal proteína foi determinada a partir da utilização de separação eletroforética em duas dimensões e espectrometria de massa (ZANATA et al., 2002a). A proteína STI1 foi então caracterizada como sendo o receptor/ligante de PrPc de 60-66kDa inicialmente descrito (MARTINS et al., 1997) e

sua interação com PrPc está envolvida com mecanismos de diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento da retina (CHIARINI et al., 2002; ZANATA et al., 2002a).

1.7 A função normal do PrPc

Um dos modelos utilizados para determinação de possíveis funções de um gene é sua eliminação em animais chamados nocautes (ou -/- ou *knockout*).

Os animais que tiveram o gene de PrPc removido (PrP -/-) são viáveis durante o período embrionário e na fase adulta (BÜELER et al., 1992), apesar deste gene ser conservado e provavelmente muito importante (GABRIEL et al., 1992).

Sinais de ataxia apresentados por uma construção particular de animais PrP-/- podem ser revertidos com a re-introdução do gene PrPc normal - animais transgênicos (SHMERLING et al., 1998). Curiosamente, a produção de transgênicos com deleção na região PrPc onde foi estudado a interação com a proteína STI1 (MARTINS et al., 1997; ZANATA et al., 2002a) não é capaz de reverter a ataxia nesta linhagem (SHMERLING et al., 1998). Desta forma, supõe-se que as formas truncadas de PrPc competem com outras moléculas substituidoras do PrPc, mas com função fisiológica semelhante, por um ligante comum. Além disso, estes dados sugerem a existência de redundância biológica entre o PrPc e outra(s) molécula(s), de modo que explicaria o desenvolvimento normal do animal PrP-/- .

1.8 PrPc e STI1

PrPc é ligante de uma co-chaperonina denominada *stress-inducible protein 1*, STI1. Esta associação determina a sinalização celular por proteína cinase dependente de AMPc e proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), que estão envolvidas com a proteção contra morte celular programada e diferenciação celular, respectivamente (CHIARINI et al., 2002; ZANATA et al., 2002).

A proteína STI1, a qual está presente na extensão de pseudópodos (BLATCH et al., 1997), foi primeiramente descrita na levedura *Sccharomyces cerevisiae*, a qual está envolvida na mediação da resposta ao choque térmico de certos genes Hsp70

(NICOLET;CRAIG, 1989). A proteína STI1 de leveduras apresenta uma identidade de aminoácidos de 42% com suas cognatas de camundongos e humanos. O padrão de localização intracelular desta proteína tem se mostrado bastante complexo, sendo a homóloga humana encontrada, por HONORÉ e seus colaboradores (1992), no complexo de Golgi, em pequenas vesículas oriundas deste e ainda no nucléolo de fibroblastos transformados SV40; enquanto discute-se uma localização citoplasmática para a homóloga murina. MARTINS e seus colaboradores (1997) demonstraram ainda que apesar de STI1 ser encontrado principalmente no citoplasma, uma pequena fração da proteína total (~6%) é encontrada na membrana celular. A presença de STI1 na superfície celular foi confirmada por ZANATA e colaboradores (2002), apesar da ausência de um domínio transmembrana ou de um peptídeo-sinal de transporte através da membrana, levando à sugestão de que a molécula de STI1 é transportada para a membrana celular em associação com outras proteínas de membrana, o que seria consistente com a detecção da proteína tanto no complexo de Golgi quanto em pequenas vesículas.

A função exata do STI1 ainda não foi elucidada, no entanto, tem sido proposto que a proteína teria um papel importante na regulação gênica (HONORÉ et al., 1992). Pesquisas têm demonstrado ainda que proteínas STI1 de diversas espécies formam complexos com as proteínas de estresse Hsp70 e Hsp90 (VAN DER SPUIY et al., 2000; VAN DER SPUIY et al., 2001).

As proteínas Hsp70 e Hsp90, primeiramente descritas como proteínas de choque térmico, atuam como chaperonas moleculares *in vivo*, reconhecendo e estabilizando intermediários durante o dobramento, montagem e desmontagem de proteínas. A proteína Hsp70 além de se ligar a polipeptídeos recém sintetizados no citoplasma, e a proteínas desnaturadas *in vitro*, também atua, através da hidrólise de ATP, na remoção da cobertura de vesículas recobertas por clatrina (GAO et al., 1991). Por outro lado, a proteína Hsp90 é, possivelmente, a proteína constitutivamente expressada mais abundante no citoplasma de eucariotos. A interação mais estudada do Hsp90 é com o receptor inativo de hormônios esteróides. Esta e outras associações

de Hsp90 aparentam ter como principal característica a estabilização de proteínas marcadas em um estado inativo, parcialmente dobradas, ou desmontadas.

A abundância do complexo STI1-Hsp70-Hsp90, conservado de leveduras a vertebrados, leva à sugestão de que estas três proteínas atuam interativamente em um contexto celular ainda não muito bem definido (SMITH *et al.*, 1993). Em experimentos com reticulócitos de coelho, onde se buscava compreender a renaturação de proteínas mediada por chaperoninas, SCHUMACHER e colaboradores (1994) encontraram grandes quantidades de um complexo formado pelas proteínas de choque térmico Hsp70, Hsp90 e STI1 atuando cooperativamente na atividade de chaperonina dependente de ATP. Além do citado, a proteína STI1 não possui atividade como chaperonina significativa neste complexo, sendo este papel desenvolvido por Hsp70 e Hsp90.

Discute-se diferentes sítios de ligação desta proteína com Hsp70 e Hsp90 usando peptídeos representativos de diferentes regiões da molécula de STI1 de camundongos, demonstrando-se que a proteína de choque térmico Hsp70 somente se liga à região N-terminal de STI1, enquanto que na região C-terminal há apenas a ligação de Hsp90. Esta interação STI1-Hsp70 e STI1-Hsp90 permite a associação íntima entre Hsp70 e Hsp90, sendo mediada por módulos de interação proteína-proteína constituídos de motivos repetidos de tetratricopeptídeos (TRP) (VAN DER SPUY *et al.*, 2001), os quais acredita-se serem importantes na formação de complexos macromoleculares. É possível que este complexo possa participar no transporte de uma série de proteínas através do citoplasma, ou, como já mencionado anteriormente, atuar como um complexo chaperonina.

Tem se tornado cada vez mais claro que as proteínas de choque térmico, quando estudadas no contexto de um organismo multicelular intacto, apresentam papéis muito além daqueles normalmente pensados para as proteínas constitutivas de manutenção. Estas proteínas têm se mostrado atuantes críticos no desenvolvimento, crescimento, sobrevivência e morte de indivíduos (KRONE *et al.*, 2003), sendo que, para o estudo destas proteínas não há nenhum outro momento em um organismo multicelular, em que as suas funções, únicas e críticas, sejam tão aparentes quanto no

desenvolvimento embrionário, uma vez que este é um momento em que as células estão continuamente mudando suas características fenotípicas e diferenciando.

A comparação da expressão gênica de hipotálamo e córtex em camundongos BALB/c jovens (2 meses) e adultos (22 meses), demonstra um aumento significativo na expressão gênica de enzimas metabólicas relacionadas com o envelhecimento. Também se evidencia uma diminuição na expressão gênica em genes codificados de proteínas relacionados com a resposta ao stress celular no envelhecimento, dentre elas a STI1 (JIANG *et al*, 2000).

Recentemente foi mostrado que a STI1 pode modular a atividade da enzima superóxido dismutase intracelular (SAKUDO *et al*, 2005) a partir da interação do PrPc com a STI1 na face externa da membrana plasmática. Além disso, empregando diversas linhagens celulares expresando mutantes de PrPc, foi possível observar que esta modulação de atividade é dependente tanto do domínio de octa-repetição de histidina (sítio de ligação a íons Cu^{2+}) como da primeira metade do domínio hidrofóbico (resíduos 106-126).

1.9 Ativação e Agregação Plaquetária

As plaquetas têm um papel central na hemostasia normal. Nos locais de lesão endotelial as plaquetas, através do fator de von Willebrand, ligam-se aos elementos subendoteliais, particularmente o colágeno. As plaquetas liberam várias substâncias ativas e inicia-se o processo de adesão plaquetária. Este tampão plaquetário é conhecido como tampão primário. Estas plaquetas sob ação do ADP, tromboxano e trombina se contraem, originando o tampão secundário. As plaquetas ativadas ao reorganizar as suas lipoproteínas expõe determinados fosfolipídeos, onde os fatores de coagulação podem se concentrar. As plaquetas ativadas aceleram a formação de trombina. A trombina ocupa uma porção central no processo de coagulação, ela é formada como resultado de uma cadeia de reações que ocorrem principalmente na membrana das plaquetas, de outras células ativadas, e no fator tissular (uma proteína de membrana que é exposta à corrente sanguínea em algumas situações), onde os

fatores de coagulação se ligam. O processo de coagulação é finalizado com o desencadeamento da cascata de coagulação e culmina com a deposição de fibrina (BOULANGER, et al., 2001).

As plaquetas circulam normalmente no sangue como entidades isoladas, que não interagem umas com as outras ou com outros tipos celulares. Entretanto, dadas as circunstâncias apropriadas, elas se transformam de um estado não adesivo para um estado adesivo. A ruptura do endotélio vascular expõe os constituintes celulares que suportam a adesão plaquetária e a sua progressão, que são críticos na estabilização do agregado de plaquetas na corrente sanguínea. O papel secundário das plaquetas é a liberação de uma variedade de substâncias que estimulam ou inibem outras plaquetas ou outras células do sangue ou dos vasos.

As substâncias secretadas pelas plaquetas atuam para estimular ou para inibir as plaquetas ou outras células sanguíneas ou vasculares, modificar o trombo nas suas propriedades mecânicas, regular a coagulação e modular o crescimento das células vasculares. Os corpos densos são as organelas plaquetárias mais rapidamente secretadas, contêm ADP (um agonista potente para recrutar outras plaquetas), ATP (um agonista para outras células do sangue) e serotonina (um efector do tônus vascular). O fator XIII é uma substância encontrada livremente no interior do citosol da plaqueta, que é responsável pela catalização e polimerização da fibrina, da fibronectina, da antiplasmina alfa₂, bem como de outros constituintes do trombo, para formar o coágulo de fibrina. Os grânulos alfa contêm uma ampla variedade de peptídeos que podem modular o crescimento e os padrões da expressão de genes de células da parede dos vasos: o fator de crescimento derivado das plaquetas, que tem um papel na proliferação dos músculos lisos; o peptídeo III ativador do tecido conectivo, que estimula a proliferação dos fibroblastos; o fator plaquetário V, que tem um papel na organização da protrombinase plaquetária; e o fator plaquetário IV, o fibrinogênio, a fibronectina, o fator de von Willebrand e a vitronectina (BRUNETTI, et al, 2000).

A agregação é a marca registrada da ativação plaquetária. Este evento é estimulado pela trombina, que liga as plaquetas e o sistema de coagulação do sangue, na formação do trombo. Subseqüentemente, o recrutamento de mais plaquetas é facilitado pela liberação de ADP e TxA₂ pelas plaquetas ativadas. Inversamente, se expostas à lesão endotelial no interior das coronárias, esta cascata normalmente hemostática pode levar à trombose e subseqüente infarto (DIETRICH-MUSZALSKA, et al., 2005).

As proteínas receptoras de adesão plaquetária servem como ligantes para receptores específicos da superfície das células. A nomenclatura é baseada na mobilidade eletroforética das proteínas da membrana em sistemas de gel de poliacrilamida, nos quais as proteínas de maior peso molecular movem-se mais lentamente. Para os receptores da GP IIb/IIIa (os mais abundantes receptores da superfície das células, perfazendo um total de até 15% das proteínas receptoras de toda a superfícies das membranas das plaquetas), os ligantes são fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e o fator de von Willebrand. A ocupação desse receptor é essencial para a agregação plaquetária (STARKE, et al., 2005).

1.10 Micropartículas

Micropartículas são pequenas vesículas (geralmente < 1 µm diâmetro), liberadas da membrana plasmática de células ativadas ou apoptóticas. Elas foram inicialmente percebidas em 1940, quando foi observado que plasma ou soro humano continham um fator subcelular que facilitava a formação de fibrina. Em 1967, através de técnicas de microscopia eletrônica, foi então demonstrado que o fator subcelular consistia de pequenas vesículas, as quais foram denominadas "platelet dust", pois apresentavam atividade pró-coagulante, semelhante a plaquetas intactas. Tal atividade pró-coagulante é devido à presença de fosfolípídeos aniônicos, como a fosfatidilserina exposta em sua superfície durante os processos de estimulação celular, a qual se torna uma superfície catalítica para o complexo pró-trombinase (DIAMANT et al, 2004).

O interesse pelas micropartículas tem aumentado substancialmente nos últimos anos, após a demonstração do aumento de sua concentração no sangue em situações

clínicas onde o risco trombótico está elevado (VAN WIJK et al, 2003) e da sua associação com a desordem hemorrágica na síndrome de Scott (TOTI et al, 1996). Atualmente, sabe-se que maioria das micropartículas encontradas no sangue é derivada de plaquetas, mas elas também podem ser derivadas de eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e células endoteliais. Além disso, suas propriedades biológicas incluem não somente as pró-coagulantes, mas também pró-inflamatórias e mediadoras de várias funções celulares(VAN WIJK et al, 2003).

1.11 Formação e características das micropartículas

Existem dois processos celulares típicos que levam à formação de micropartículas: a ativação celular e a apoptose. A ativação celular pode ser disparada por diversos agonistas. As plaquetas são ativadas por trombina, ionóforo de cálcio A23187, ADP mais colágeno, complexo C5b-9 do sistema complemento e *shear stress* (SIMS et al., 1988; SIMS et al., 1989; GILBERT et al., 1991; TANS et al., 1991; WIEDMER et al., 1991; GEMMELL et al., 1993; FOURCADE et al., 1995; MIYAZAKI et al., 1996; SILJANDER et al., 1996; BARRY et al., 1997; HOLME et al., 1997; TAUBE et al., 1999; FORLOW et al., 2000). Monócitos, células endoteliais, hepatócitos e células musculares lisas liberam micropartículas quando ativadas por lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas (como TNF-alfa, IL-1), complexo C5b-9 ou hidróperóxido (LEEWENBERG et al., 1992; PATEL et al., 1992; SATTA et al., 1994; MIYOSHI et al., 1996; COMBES et al., 1999; SCHECTER et al., 2000). Na ativação, ocorre um aumento na concentração intracelular de cálcio, o qual leva a ativação de proteína quinases e inibição de proteína fosfatases, e ativação de calpaína, que degrada talina, permitindo a vesiculação na membrana plasmática (VAN WIJK, et al., 2003). No caso da apoptose, que se caracteriza por contração muscular, fragmentação do DNA e vesiculação dinâmica da membrana, a formação de micropartícula resulta da ativação de ROCK I "*Rho-associated kinase*" pelas caspases, geração de uma força contrátil pelo complexo actina-miosina e formação das vesículas. Como na apoptose, o DNA fragmentado migra do núcleo para as vesículas e corpos apoptóticos, estas micropartículas podem conter DNA fragmentado (VAN WIJK et al., 2003).

Em termos de composição, as micropartículas consistem basicamente de lipídeos e proteínas, as quais variam de acordo com a origem celular e o processo de formação. Recentemente, o proteoma de micropartículas plasmáticas de doadores saudáveis detectou a presença de mais de 1000 *spots* e resultou na identificação de 169 proteínas abundantemente presentes, dentre as quais as 10 mais abundantes são imunoglobulina cadeias μ e κ , fibrinogênio (cadeias α , β , e γ), actina, albumina, integrina α -IIb, cadeia J da imunoglobulina, polipeptídeo 6 leve da miosina, profilina I e ciclofilina A (JIN et al., 2005). Além dessas, destacam-se proteínas do citoesqueleto ou ligantes de actina, proteínas citossólicas, como chaperonas, moléculas sinalizadores, antioxidantes, elementos do proteassoma e enzimas metabólicas. Também foi demonstrado que cerca de 80% das micropartículas isoladas de condições fisiológicas são derivadas de plaquetas (JIN et al, 2005). Os lipídeos que constituem a membrana vesicular estão distribuídos de modo assimétrico na bicamada, com fosfolipídeos carregados negativamente para o lado externo da vesícula, como fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (ZWAAL et al., 1997). Entretanto, há ainda poucos dados na literatura sobre a composição lipídica das micropartículas. Em micropartículas de doadores saudáveis, foi verificado que aproximadamente 60% dos lipídeos correspondem a fosfatidilcolina, e os 40% restantes correspondem a esfingomiélin, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (WEERHEIM et al., 2002). As composições de micropartículas isoladas de líquido sinovial de pacientes com artrite (FOURCADE et al., 1995) e de células endoteliais exposta a estresse oxidativo (HUBER et al., 2002) foram analisadas e mostraram-se claramente diferentes da descrita para o sangue de doadores saudáveis, indicando a dependência da origem celular e estímulo na composição lipídica das micropartículas (ZWAAL et al., 1997).

1.12 Micropartículas em situações patológicas

Inúmeras situações patológicas têm sido descritas onde há um aumento no número de micropartículas plasmáticas, como síndromes agudas coronarianas (TATE et al., 1992; MALLAT et al., 2000), arteriosclerose (NOMURA et al., 2000), diabetes (NOMURA et al., 1994; NOMURA, 1995), hipertensão (NOMURA et al., 1994),

trombocitopenia idiopática (NOMURA et al., 1991; JY, 1992), lupus anticoagulante (COMBES et al., 1999), hemoglobínúria paroxística noturna (HUGEL et al., 1999), pré-eclampsia (VAN WIJK et al., 2002), sepse (JOOP et al., 2001; NIEUWLAND et al., 1997), inflamação sistêmica (OGURA et al., 2001) e uremia (NOMURA et al., 1994). Dentre as células de origem dessas micropartículas incluem plaquetas, células endoteliais e leucócitos. Interessantemente, as micropartículas aparecem em concentrações plasmáticas elevadas em doenças que envolvem hipercoabilidade. Assim, como a hipercoabilidade é uma característica de doenças cardiovasculares, as micropartículas possivelmente desempenham um papel importante no desenvolvimento do estado pró-trombótico de tais doenças. Analogamente, a geração de micropartículas é reduzida em diversas desordens hemorrágicas, como a síndrome de Scott (SIMS et al., 1989) e a doença de Glanzmann (GEMMELL et al., 1993).

Especificamente em relação às síndromes coronárias, a identificação de micropartículas no sangue periférico de pacientes portadores de doença arterial coronariana tem sido bastante evidenciada. Inicialmente observou-se aumento nos níveis de micropartículas ligantes de anexina V por meio de técnicas de citometria de fluxo e que apresentavam atividade pró-trombótica *in vitro* (MALLAT et al., 2000). Outros estudos demonstraram aumento de micropartículas derivadas do endotélio, que seriam marcadores de lesão endotelial (BERNAL-MIZRACHI et al., 2003). Em vários destes estudos tentou-se associar a presença e o número destas partículas à evolução clínica ou ao prognóstico destes pacientes, com resultados por vezes contraditórios (BERNAL-MIZRACHI et al., 2003). Micropartículas de pacientes com infarto agudo do miocárdio inibem o relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos, provavelmente afetando a via de transdução do óxido nítrico endotelial (BOULANGER et al., 2001).

1.13 Efeitos biológicos de micropartículas

A atividade pró-coagulante das micropartículas tem sido proposta, devido às diversas evidências tanto *in vitro* como *in vivo*. Contudo, vários trabalhos têm demonstrado que as micropartículas, através de proteínas específicas ou dos lipídeos

bioativos presentes em sua composição, atuam também em diversos outros processos celulares (MOREL et al., 2004).

Micropartículas de plaquetas expressam vários receptores de adesão plaqueta-endotélio em sua superfície, como a glicoproteína IIb/IIIa (CD41), Ib e IaIIa, e P-selectina (CD62P), além de lipídeos bioativos, como a esfingosina 1-fosfato e o ácido araquidônico (BARRY et al., 1999), os quais podem disparar algumas respostas celulares. Por exemplo, elas são capazes de inibir apoptose em leucócitos polimorfonucleares (BRUNETTI et al., 2000), estimular a proliferação de células musculares lisas através da via de p42/p44 MAP quinases e de modo independente de PDGF (WEBER et al., 2000). Além disso, estimula a migração, proliferação, adesão e sobrevivência de células hematopoiéticas, ativando vias de p42/p44 MAP quinase, PI3-K-AKT e STAT (BAJ-KRZYWORZEKA et al., 2002). Fitzgerald e colaboradores também demonstraram que as micropartículas de plaqueta ativam respostas celulares, como a ativação transcelular de plaquetas e células endoteliais pelo ácido araquidônico derivado da micropartícula (BARRY et al., 1997) e o aumento na adesão de monócitos às células endoteliais através do aumento na expressão de moléculas de adesão nos dois tipos celulares (NOMURA et al., 1995).

Micropartículas de linfócitos T produzidas *in vitro* também mostraram-se vasoativas, ao induzir disfunção endotelial em artérias através da alteração de NO sintase endotelial e caveolina1 (MARTIN et al., 2004).

1.14 PrPc e Plaquetas

No fluxo sanguíneo humano, a maioria de PrPc (95%) está distribuída entre o plasma -68,5% e plaquetas -26,5% (MACGREGOR et al., 1999). Estudos com citometria de fluxo demonstram que 96% das interações que ocorrem durante a agregação plaquetária, envolvem também interação de PrPc com outras células. Mais do que isto, o componente intracelular plaquetário contém uma concentração significativa de PrPc armazenado dentro de α -grânulos (HARRISON et al, 1999). Após a ativação plaquetária, este PrPc é translocado destes grânulos para a membrana plasmática, podendo se tornar PrPc livre da célula (PERINI et al, 1996).

Estes estudos alavancaram com as transfusões de sangue ligadas com a transmissão de vCJD em humanos. Um paciente que recebeu transfusão de células vermelhas desenvolveu a doença 6,5 anos mais tarde, e o doador desenvolveu a doença de vCJD 3,5 anos após ter realizado a doação. A probabilidade de ocorrer tal caso relatado é de 1 em 15 000 a 1 em 30 000, sugerindo, indiscutivelmente, que doenças priônicas podem ser transmitidas por transfusão sangüínea (STARKE et al, 2005). A partir deste trabalho, que se iniciou em 5 de abril de 2004, os E.U.A. não coleta sangue de doadores que receberam transfusão sangüínea após 1980. Pesquisas mais recentes afirmam que, não é possível infectar animais com sangue de pacientes portadores de vCJD, mas a infecção é positiva se utilizar cérebro ou tecidos linfáticos de pacientes com a doença (BRUCE et al, 2001).

2. OBJETIVOS

- (1) Validar a utilização de anticorpos anti-PrPc e anti-STI1 produzidos no laboratório como ferramenta biológica adequada para este estudo;
- (2) Avaliação a presença da proteína prion celular (PrPc) em plaquetas humanas e micropartículas;
- (3) Verificar a expressão de STI1 em plaquetas humanas e micropartículas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Anticorpos anti-rSTI-1 foram obtidos a partir da imunização de coelhos neozelandeses com His₆-rSTI-1 purificada em coluna de NTA-Ni-Agarose. Estes anticorpos foram fornecidos na forma de imunoglobulinas purificadas pelo fornecedor Bethyl Co. (USA).

Para obtenção de anticorpos anti-rPrPc em animais nocaute, 15µg de proteína recombinante (His₆-PrPc) foram injetadas na cavidade intraperitoneal na forma de emulsão com adjuvante completo de Freund (Sigma) na primeira imunização e incompleto nos demais reforços. Os soros dos animais M45, M48 e M49 foram utilizados na maioria dos ensaios.

Todos os anticorpos utilizados foram testados por mais de uma técnica analítica ("Western blotting", FACS, ELISA, imunofluorescência), mostrando-se específicos contra seus antígenos e não apresentando reação cruzada com outras moléculas.

Anticorpos secundários anti-Ig de camundongo e anti-Ig de coelho acoplados a peroxidase foram obtidos da empresa Sigma Co. (St. Louis, USA)

3.2 Linhagem celular

A linhagem A171 (glioblastoma humano - gentilmente cedida pela Dra. Anamaria Aranha Camargo, Ludwig Institute for Cancer Research – São Paulo) foi mantida em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino e cultivada em frascos de plástico (TPP GmbH, Switzerland) em estufas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada 95%.

3.3 Preparação de fração protéica de 55% (fração 55%) de sulfato de amônio e de membrana plasmática de cérebro de camundongos (Martins et al., 1997).

Extrato total de cérebros e a fração protéica precipitada com 55% de sulfato de amônio foram preparadas a partir da homogeneização de cérebros de camundongos

Balb-c sacrificados por disjunção medular na altura do pescoço como anteriormente descrito (MARTINS et al., 1997). No caso da fração 55%, cortes com 30% e 45% de sulfato de amônio foram feitos nas etapas de pré-purificação da proteína de 66kDa. Após a preparação os extratos protéicos foram em seguida estocados à -70°C, quando não utilizados imediatamente. Todas as etapas de preparação foram levadas a cabo a 4°C.

Já a reparação de extrato de membrana celular de cérebros de camundongos foi feita segundo descrito na literatura (ARVAN et al., 1983) e anteriormente empregado pelo nosso grupo (MARTINS et al., 1997).

3.4 Preparação de extratos celulares

Células foram coletadas dos recipientes de cultura lavadas 2 vezes com PBS gelado e lisadas em tampão de lise (PBS acrescido de 1% e NP-40 e inibidores de protease Complete (Roche) por incubação no gelo por 15 minutos. Os lisados foram centrifugados a 20000xg por 10 minutos a 4°C. Pequena fração do sobrenadante foi armazenado para análise posterior em SDS-PAGE, sendo o restante imediatamente submetido a reação de imunoprecipitação.

3.5 Reação de "Western blotting" (ZANATA et al., 2002a,b)

As proteínas dos extratos totais celulares ou teciduais foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (SDS-PAGE). Aplicaram-se as soluções protéicas no gel, misturadas com tampão de amostra redutor, após fervura por 5 minutos.

As proteínas separadas através de SDS-PAGE foram transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (0,45 µm - Schleicher & Schuell, Alemanha) durante 1 hora sob corrente constante de 0,8 mA/cm² no sistema Nova blot (Pharmacia) em tampão de transferência (39mM de glicina (Merck), 48mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol). Para averiguação da eficiência de transferência usou-se corante Ponceau (Sigma).

As membranas foram então bloqueadas (durante 2 horas) com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé) e incubadas com anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio a 4°C durante 16 horas. As membranas, após 3 lavagens de 10 minutos com TBST, foram incubadas com anticorpo anti-Ig de camundongo ou coelho conjugado com peroxidase (Pharmingen), diluído 1:10000 em tampão de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente. Após uma nova série de lavagens, revelaram-se as membranas com substrato adequado para reação quimioluminescente (Amersham-Pharmacia). Um filme radiográfico (Kodak) foi exposto a membrana até obtenção do sinal adequado.

3.6 Obtenção de micropartículas de plaquetas por ativação com ionóforo de cálcio e trombina

As plaquetas foram obtidas de bolsas de concentrado de plaquetas no Hemobanco de Curitiba. As bolsas eram doadas dentro do seu prazo de uso clínico ou vencidas no máximo por 1 dia. O volume total da bolsa (cerca de 60 mL) foi dividido em 2 tubos com 30 mL cada. O pH do concentrado de plaqueta foi ajustado com ácido cítrico 0,15M para o pH 6,4 e 50 nM de PGE1 foi adicionada a cada tubo. Estes foram centrifugados (160g, 10 min, T. amb). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi coletado, transferido para tubos novos e centrifugados (1400g, 10 min, T. amb). O *pellet* plaquetário foi gentilmente ressuspense em 0,5 mL de tampão Tyrode pH 6,4 (NaCl 0,137M, KCl 2,68mM, NaHCO₃ 11mM, NaH₂PO₄ 0,434mM, MgCl₂ 1mM, D-glicose 5,5mM, Hepes 5 mM). Uma alíquota de 10 µL desta suspensão foi utilizada para a contagem no número de plaquetas. Para isso, os 10 µl da suspensão foram misturados a 190 µl de oxalato de amônio 1%, e 10 µl desta solução foram aplicados em uma câmara de Neubauer. Após a ressuspensão, um volume conhecido de Tyrode foi adicionado (0,3 mL/mL concentrado inicial), e a suspensão foi novamente centrifugada (1400g, 10 min, T. amb). O *pellet* plaquetário foi então ressuspense em tampão Tyrode pH 7,4 contendo cálcio (NaCl 0,140 M, KCl 2,7mM, MgCl₂ 1mM, D-glicose 5 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 2mM). A concentração de plaquetas foi ajustada para 10⁹/mL com o mesmo tampão acima. Esta suspensão foi dividida em 3 tubos, para

ativação com ionóforo de cálcio A23187 10 μ M, trombina 0,25 U/mL e o controle negativo sem ativador. Os tubos foram incubados a 37°C, por 30 min e depois centrifugados (1500g, 10 min, T.amb) para remoção de restos celulares ou células inteiras. O sobrenadante foi então novamente centrifugado (16.000g, 60 min, 4°C). O *pellet* contendo as micropartículas foi ressuscitado em 200 μ L de PBS contendo 1mM PMSF, e utilizado imediatamente nos ensaios de atividade biológica em células em cultivo ou congeladas a -20°C para análise por *Western blotting*. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

3.7 Obtenção de lisado de plaquetas

Seguindo-se as etapas anteriormente descritas até o ponto de ressuspensão do *pellet* plaquetário em tampão Tyrode pH 6,4, cerca de 0,3 mL da suspensão foram coletados para obtenção do lisado de plaquetas. Para isso, a suspensão foi centrifugada (1400g, 10 min, T. amb) e o *pellet* foi lisado com 100 μ L de tampão de lise (1% NP40 em PBS) gelado contendo o coquetel de inibidores de protease (Roche). O lisado foi mantido no gelo por mais 30 min, e centrifugado (12.000g, 10 min). O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sua concentração protéica foi determinada, e congelado a -20°C.

4. Resultados e Discussão

Como ponto de partida na investigação da expressão de PrPc e STI1 em diferentes amostras foi necessária a completa caracterização dos reagentes que seriam utilizados. Neste contexto anticorpos policlonais são empregados como bioreagentes que se ligam especificamente aos antígenos de interesse. Entre as diversas vantagens na produção dos próprios reagentes pode-se incluir: 1. independência na obtenção do reagente; 2. produção de reagentes que atendam demandas específicas do grupo; 3. minimização de custos de importação uma vez montada a estrutura básica de produção dos mesmos e 4. indisponibilidade comercial de reagentes que atendam demandas específicas.

Assim, no caso de PrPc e STI1, optou-se pela produção de anticorpos policlonais que reconheçam estes antígenos em diversos tipos de ensaios. Tipicamente tais anticorpos são empregados em ensaios de localização tecidual (imunohistoquímica) e celular (imunocitoquímica acoplada a microscopia de fluorescência), ELISA e *immunoblotting*. Para a utilização de tais reagentes faz-se extremamente necessária a validação da capacidade de reconhecimento dos antígenos de interesse de forma específica.

Para a produção de anticorpos policlonais que se liguem ao PrPc foram utilizados animais (camundongos) nocaute para o gene que codifica o PrPc. Uma vez que estes animais são biologicamente viáveis por mais de 500 dias e não possuem a proteína PrPc, o que os torna susceptíveis a produção de altos títulos de anticorpos especificamente reativos contra esta proteína, foram empregados camundongos com este genótipo (Büeler et al., 1992) para a obtenção de soro policlonal hiperimune.

Na figura 1 é apresentada reação típica de *Western blotting* de soro policlonal de animais nocaute imunizados com PrPc recombinante (rPrPc). O soro policlonal reage especificamente tanto com o PrPc endógeno expresso no cérebro de camundongos selvagens (linha 1) como com o antígeno expresso em sistema heterólogo de *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (linha 2). É interessante notar que os anticorpos gerados contra a proteína recombinante, isto é, que não

sofreu nenhuma modificação pós-traducional observada em eucariotos (*e.g.* glicosilação), reconhecem as três isoformas de PrPc: biglicosilada, monoglicosilada e não-glicosilada (fração 30% de saturação de sulfato de amônio de extrato total de cérebros de camundongo, figura 1, linha 1, seta superior para a inferior respectivamente). Este fato sugere que os epítomos reconhecidos pelos anticorpos dos animais imunizados não estão situados nas regiões que receberão glicosilação na molécula expressa no sistema nervoso de camundongos. Na linha 2 é apresentada a reatividade do anti-rPrPc contra o antígeno utilizado nas imunizações. Pode ser observada uma banda de menor massa molecular (asterisco) abaixo da banda predominantemente reconhecida pelo anticorpo. Tal banda provavelmente representa degradação da proteína recombinante durante o processo de purificação.

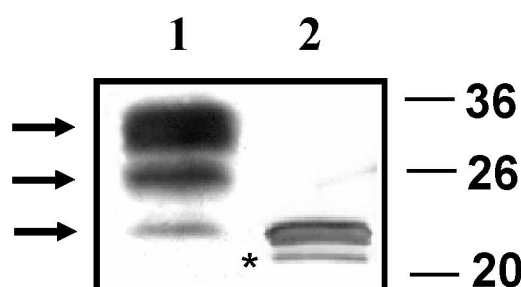


Figura 1. Anticorpos anti-rPrPc reconhece PrPc presente no Sistema Nervoso Central e heterologicamente expresso em bactérias. Fração 30% de saturação de sulfato de amônio de homogenato total de cérebro de camundongo (linha 1) e PrPc expresso em sistema heterólogo de *E. coli* e purificado por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (linha 2) foram separados eletroforéticamente em gel 12,5% de poliacrilamida e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram reagidas com anticorpo anti-rPrPc (1:2.000) durante 16 horas e anti-Ig de camundongo acoplado a HRPO (1:10.000). As membranas foram reveladas por reação quimioluminescentes a autoradiogramas expostos a elas em diferentes intervalos de tempo até obtenção da melhor marcação. É possível notar que na amostra do SNC a presença do PrPc é evidenciada pelas três isoformas de glicosilação (biglicosilada, monoglicosilada e não-glicosilada, de cima para baixo, três setas). Já a molécula recombinante possui apenas uma isoforma (não-glicosilada) uma vez que em bactérias este tipo de modificação pós-traducional não é verificada. O asterisco mostrado na linha 2 provavelmente é um produto de degradação do rPrPc co-purificado durante o processo de purificação. Os números a direita representam o posicionamento dos marcadores de massa molecular (em kDa) separados em paralelo com a amostra.

A utilização de antígeno parcialmente degradado nos protocolos de imunização tipicamente não altera a resposta imune do animal inoculado. De fato, poderia até potencializar a obtenção de anticorpos contra epitopos que estariam mergulhados na estrutura terciária da proteína. Como as doenças priônicas envolvem uma profunda mudança conformacional do PrPc para o PrPsc, tais anticorpos poderiam reconhecer antígenos específicos da forma anormal da proteína (PrPsc) que não estão presentes na forma PrPc ou rPrPc.

A reação tanto sobre PrPc como rPrPc é altamente específica pois o soro pré-imune dos animais imunizados não se ligam a nenhuma proteína com mesmo perfil eletroforético de migração (dado não mostrado).

Já para a proteína STI1, coelhos foram utilizados nos protocolos de imunização uma vez que a quantidade de soro hiperimune produzido é adequada às necessidades do grupo quando comparado ao reduzido volume produzido por camundongos. Infelizmente, ainda não são disponíveis animais nocaute para o gene que codifica STI1, de forma que a abordagem empregada para o PrPc não pôde ser aqui empregada.

Como pode ser observado na figura 2, os anticorpos policlonais produzidos contra a seqüência de camundongo de STI1 reconhece especificamente a proteína recombinante expressa em sistema heterólogo de *E. coli* (antígeno recombinante, linha 1), a proteína STI1 de origem humana expressa em células da linhagem A172 (glioblastoma, linha 2) e a proteína expressa no cérebro de camundongos (fração 55% de saturação de sulfato de amônio de extrato total de cérebros de camundongo, linha 3).

Quando rSTI1 é utilizado como antígeno no ensaio de *Western blotting* (figura 2, linha 1, seta com duas cabeças) muitas bandas são reconhecidas pelo soro policlonal anti-rSTI1. Da mesma forma que observado para rPrPc (figura 1, linha 2) o anticorpo reconhece vários produtos de degradação do antígeno íntegro (66 kDa). A proteólise durante as diversas etapas de purificação das moléculas recombinantes esta constantemente presente. Esta degradação pode ser iniciada tanto durante o processo

de síntese protéica pela bactéria como após a lise química ou mecânica do microrganismo. O abaixamento da temperatura (4°C), a utilização de agentes desnaturantes (uréia e guanidina) e a combinação de diversos inibidores sintéticos e peptídicos de proteases (coquetel de inibidores, Roche, Mannheim, Alemanha) são procedimentos normalmente empregados separadamente ou combinados.

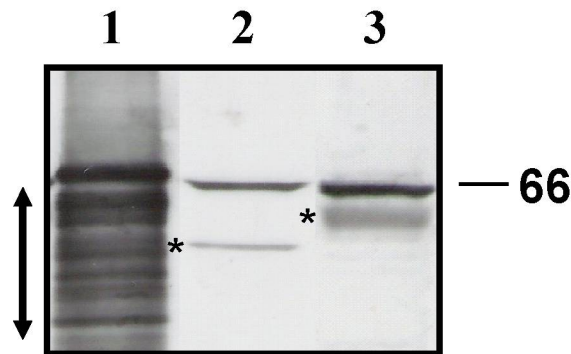


Figura 2. Anticorpos anti-rSTI1 reconhece STI1 presente no Sistema Nervoso Central de camundongos e humanos e heterologamente expresso em bactérias. STI1 expresso em sistema heterólogo de *E. coli* e purificado por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (linha 1), extrato total (50ug) de células da linhagem de glioblastoma humano A172 e Fração 55 % de saturação de sulfato de amônio de homogenato total de cérebro de camundongo (linha 3) foram separados eletroforéticamente em gel 10% de poliacríalmida e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram reagidas com anticorpo anti-rSTI1 (1:2.000) durante 16 horas e anti-Ig de coelho acoplado a HRPO (1:5.000). As membranas foram reveladas por reação quimioluminescentes a autoradiogramas expostos a elas em diferentes intervalos de tempo até obtenção da melhor marcação. É possível notar que a uma banda é predominantemente reconhecida pelo anticorpo na linha 1 (rSTI1) e várias outras bandas de menor intensidade e massa molecular são reveladas (seta de duas cabeças). Estas bandas provavelmente representam formas de degradação protéica co-purificadas durante a etapa cromatográfica por IMAC. Tanto a STI1 expressa em murinos como em humanos apresentam isoformas de massa molecular inferior a da forma predominantemente reconhecida pelo anticorpo (linha 2 e 3, asteriscos). Supõem-se que esta forma menor seja produto de fosforilação ou qualquer outra modificação pós-traducional ainda não descrita para esta proteína. O número a direita representa o posicionamento do marcador de massa molecular (em kDa) separado em paralelo com a amostra.

A linha 2 (figura 2) demonstra que anticorpos anti-rSTI1 de seqüência murina se liga a STI1 expressa por linhagem humana. Tal fato é explicado pelo grau de semelhança entre as seqüências peptídicas humana e murina de STI1. Como era esperado o anti-rSTI1 se liga especificamente a STI1 expressa no cérebro de camundongos (linha 3, figura 2). Nas amostras de STI1 murina (linha 3) e humana (linha 2) podem ser observadas uma forma de massa molecular menor (asterisco) do que aquela predominantemente reconhecida pelo anti-rSTI1. Esta isoforma de menor massa já havia sido descrita pelo nosso grupo (Martins et al., 1997, Zanata et al., 2002) e foi recentemente confirmada na literatura (Sakudo et al., 2005). Supõe-se que tal banda seja resultado de fosforilação ou processamento proteolítico específico sofrido pela STI1 durante seu funcionamento (Sakudo et al., 2005), entretanto tais explicações não passam de especulações e as formas processadas de STI1 deverão ser mais detalhadamente investigadas.

Uma vez testada a capacidade dos reagentes produzidos pelo grupo no reconhecimento específico das moléculas de interesse, partiu-se para a avaliação da presença de PrPc em plaquetas.

Na figura 3 pode ser observado que sobre extrato protéico de plaquetas humanas (linha 2) anti-rPrPc reage especificamente com bandas de mesmo perfil eletroforético de migração que o PrPc murino expresso no cérebro de camundongos (controle positivo, linha 1). A banda predominantemente reconhecida pelo anticorpo é a forma bi-glicosilada, ou seja a forma madura da molécula de PrPc. Não é possível saber se apenas a forma de alta glicosilação está presente na plaqueta ou o método de detecção não é sensível o bastante para detecção das outras isoformas. Nossos dados confirmam resultados publicados na literatura, entretanto a abordagem dada está centrada quanto a importância da expressão de PrPc em plaquetas no que tange a possibilidade de transmissão de doenças priônicas por procedimentos transfusionais. Nosso enfoque experimental está calcado na investigação do papel normal do PrPc em

plaquetas e não voltado para a doença que envolve sua conversão na forma infecciosa.

A figura 4 apresenta dados interessantes com relação à expressão de isoformas de PrPc de massa molecular superior àquela predita pelo gene codificador desta proteína. Tanto na amostra oriunda de cérebros de camundongos (linha 1, asteriscos) como nas plaquetas humanas (linha 2, seta) isoformas de massa molecular maior que a prevista são reconhecidas pelo anti-rPrPc.

Foi descrito na literatura uma isoforma de 60 kDa presente em uma linhagem de neuroblastoma murino que expressava PrP de hamster (Priola et al., 1995). Esta isoforma aparentemente é constituída por um dímero de PrPc unido por interações covalentes, uma vez que vários métodos de desnaturação (*e.g.* tratamento com 2-mercaptoetanol e guanidina) não foram eficientes na separação do dímero. Além disso, a isoforma é sensível ao tratamento por proteinase K sugerindo que a isoforma de 60 kDa possui tanto características do PrPc como do PrPsc (PRIOLA et al., 1995).

As isoformas apresentadas na figura 4 comportam-se em parte àquelas descritas na literatura uma vez que continuam presentes tanto após separação eletroforética em gel desnaturante (contém dodecil sulfato de sódio) e sob condições redutoras (contém 2-mercaptoetanol).

Recentemente foi descrita a expressão de isoformas de alta massa molecular em plaquetas após ativação (JONES et al., 2005). Nossos resultados confirmam a presença destas isoformas de maior massa molecular. Interessante notar que na literatura as isoformas de alta massa estão presentes apenas em plaquetas ativadas, uma vez que em lisados de plaquetas em repouso apenas a forma monomérica é encontrada (JONES et al., 2005). Estes dados sugerem que as diferenças na expressão das isoformas de massa molecular superior em plaquetas, apresentadas nas figuras 3 e 4, possam ser reflexo do grau de ativação das mesmas no momento do ensaio. Infelizmente não há nenhum dado na literatura quanto à função biológica destas isoformas.

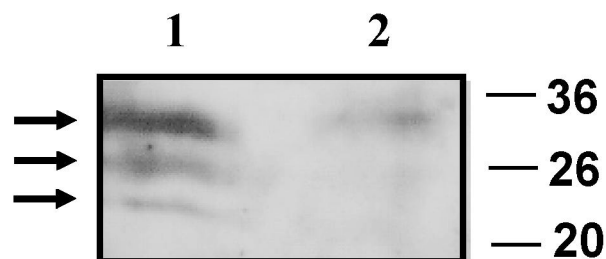


Figura 3. PrPc está presente em plaquetas humanas Fração 30% de saturação de sulfato de amônio de homogenato total de cérebro de camundongo (linha 1) e lisado total de lavado de plaquetas humanas (linha 2) foram separados eletroforéticamente em gel 12,5% de poliacrilamida e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram reagidas nas mesmas condições da figura 1. É possível notar que na amostra do SNC a presença do PrPc é evidenciada pelas três isoformas de glicosilação (biglicosilada, monoglicosilada e não-glicosilada, de cima para baixo, três setas). No lisado de plaquetas está presente apenas as formas glicosiladas sendo a de forma mais madura a de maior expressão. Os números a direita representam o posicionamento dos marcadores de massa molecular (em kDa) separados em paralelo com a amostra.

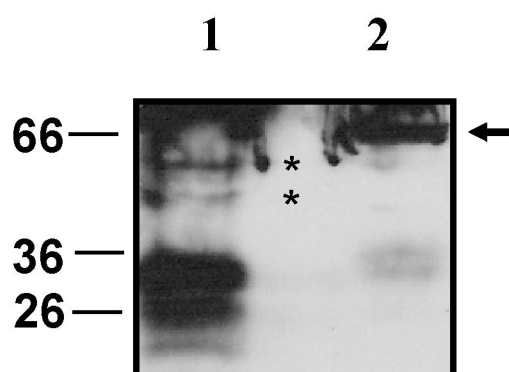


Figura 4. Formas multiméricas de PrPc estão presentes no SNC de camundongos e em plaquetas. Fração 30% de saturação de sulfato de amônio de homogenato total de cérebro de camundongo (linha 1) e lisado total de lavado de plaquetas humanas (linha 2) foram separados por SDS-PAGE a 12,5% e transferidos para matriz de nitrocelulose. As proteínas foram reagidas nas mesmas condições da figura 3. É possível notar que na amostra do SNC a presença do PrPc é evidenciada pelas três isoformas de glicosilação enquanto no lisado de plaquetas apenas a isoforma de alta glicosilação é reconhecida (linha 2) . Interessante observar que em ambas as amostras foram detectadas isoformas de alta massa. No SNC (linha 1) o anti-rPrPc reagiu com bandas situadas entre 60-50 kDa (asteriscos) enquanto no lisado de plaquetas foi evidenciada uma banda de 66 kDa (seta). Os números a direita representam o posicionamento dos marcadores de massa molecular (em kDa) separados em paralelo com a amostra.

Depois de estabelecida de forma inequívoca a presença de PrPc em plaquetas humanas foi investigada a possibilidade do ligante de PrPc, STI1, estar sendo expresso também em plaquetas, uma vez que STI1 deve participar da função biológica do PrPc, como proposto pelo nosso grupo (ZANATA et al., 2002, CHIARINI et al., 2002) e por outros laboratórios (SAKUDO et al., 2005).

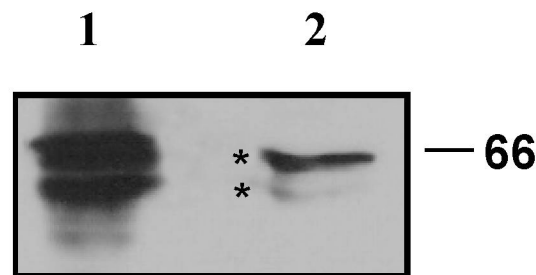


Figura 5. STI1 está presente em plaquetas humanas. Fração 55 % de saturação de sulfato de amônio de homogenato total de cérebro de camundongo (linha 1) e lisado total de lavado de plaquetas humanas (linha 2) foram separados eletroforéticamente em gel 10% de poliacrilamida e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram reagidas com anticorpo anti-rSTI1 (1:2.000) nas mesmas condições da figura 2. É possível notar tanto no SNC (linha 1) como no lisado de plaquetas (linha 2) as duas isoformas de STI1 estão presentes (asteriscos). Esta é a primeira vez que é reportada na literatura a presença de STI1 em plaquetas humanas. O número à direita representa o posicionamento do marcador de massa molecular (em kDa) separado em paralelo com a amostra.

Empregando o mesmo tipo de amostra utilizada anteriormente pode-se observar a expressão das duas isoformas de STI1 em plaquetas (figura 5, linha 2). A reação é específica uma vez que o anticorpo anti-rSTI1 reage com as duas isoformas presente na fração 55% de saturação de sulfato de amônio de extrato total de cérebro de camundongo (controle positivo, figura 5, linha 1). Aparentemente a forma de menor massa molecular tem expressão muito pequena se comparada à isoforma predominantemente reconhecida pelo anti-rSTI1. Não sabemos ainda qual a função biológica da STI1 na plaqueta e se sua expressão está ou não relacionada à expressão e função de PrPc na plaqueta.

Recentemente foi descrita uma diminuição na atividade da SOD em pacientes portadores de esquizofrenia, bem como um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nestes pacientes (DIETRICH-MUSZALSKA et al., 2005). Já que em neurônios a atividade SOD pode ser modulada por intermédio da STI1 (SAKUDO et al., 2005) especula-se que a STI1 poderia estar também envolvida com a atividade SOD em plaquetas, tanto na manutenção da homeostase corpórea como em caso de doenças neurodegenerativas.

Pelo que foi descrito na introdução a importância de micropartículas tanto em situações fisiopatológicas como o seu efeito biológico em diversos alvos levou-nos a investigar a presença de PrPc e STI em micropartículas.

Nas condições experimentais empregadas na execução deste trabalho não foi possível identificar a presença de PrPc em micropartículas humanas obtidas a partir da ativação de plaquetas com trombina, um potente agonista de ativação plaquetária. Como pode ser observado na figura 6, apesar do anticorpo anti-rPrPc reconhecer as três isoformas de PrPc expresso no cérebro de camundongos (controle positivo, linha 1), ausência de reatividade foi observada no concentrado protéico de micropartículas. A presença de PrPc na membrana de micropartículas endoteliais humanas foi verificada por *immunoblotting* e citometria de fluxo (SIMAK et al., 2002), entretanto tal expressão foi avaliada como uma possível fonte de transmissão de prions através da prática transfusional.

Possíveis explicações para a não detecção de PrPc na preparação de micropartículas utilizada incluem a baixa quantidade total de proteína que foi empregada ou a sensibilidade do método não é adequada. Uma possibilidade seria o enriquecimento da amostra em Prpc fazendo precipitações seriadas com sulfato de amônio ou aumentar a massa de proteínas resolvidas em uma mesma linha do gel.

Devido a completa ausência de dados na literatura quanto á expressão de STI1 em micropartículas humanas, procurou-se investigar se o ligante de PrPc está presente neste fragmento plaquetário.

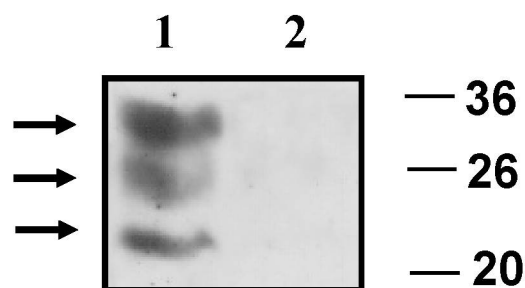


Figura 6. PrPc não foi detectado em micropartículas de plaquetas humanas Fração 30% de saturação de sulfato de amônio de homogenato total de cérebro de camundongo (linha 1) e lisado total de micropartículas de plaquetas humanas obtidas por ativação com trombina (linha 2) foram separados eletroforéticamente em gel 12,5% de poliacrilamida e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram reagidas nas mesmas condições da figura 1. É possível notar que na amostra do SNC a presença do PrPc é evidenciada pelas três isoformas de glicosilação enquanto nenhuma banda pode ser detectada na preparação de micropartículas (linha 2). Apesar de já ter sido descrita na literatura a presença de PrPc neste tipo de fragmento da membrana plasmática de plaquetas, não foi possível detectar sua presença nas condições experimentais conduzidas neste trabalho. Possíveis causas para a não detecção incluem baixa concentração protéica da amostra e detecção pouco sensível nestas condições experimentais.

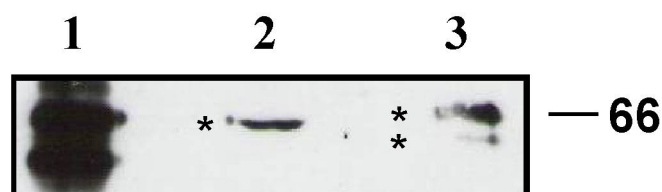


Figura 7. STI1 está presente em micropartículas humanas. Fração 55 % de saturação de sulfato de amônio de homogenato total de cérebro de camundongo (linha 1), lisado total de micropartículas de plaquetas humanas obtidas por ativação com trombina (linha 2) e lisado total de lavado de plaquetas humanas (linha 3) foram separados por SDS-PAGE 10% e imobilizadas sobre membrana de nitrocelulose. As proteínas foram reagidas com anticorpo anti-rSTI1 (1:2.000) nas mesmas condições da figura 5. É possível notar tanto no SNC (linha 1, controle positivo) como no lisado de plaquetas (linha 3 e figura 5, linha 2) as duas isoformas de STI1 estão presentes (asteriscos). Além disso, foi possível verificar a presença de STI1 em preparação de micropartículas humanas (linha 2). Aparentemente apenas a isoforma de maior massa molecular está presente nesta amostra (asterisco, linha 2). Esta é a primeira vez que é reportada na literatura a presença de STI1 em micropartículas de plaquetas humanas.

Na figura 7 é possível observar que STI1 está presente em micropartículas humanas obtidas a partir da ativação de plaquetas com trombina (linha 2). O padrão eletroforético de migração é condizente com o controle positivo reagido simultaneamente com o anticorpo anti-STI1 (linha 1) e a presença de STI1 em lisado total de plaquetas (linha 2 e figura 6, linha 2). Aparentemente a isoforma de maior massa molecular é a única presente em micropartículas. Não sabemos ainda se há alguma relevância biológica neste achado ou se este é apenas artefato experimental como consequência de baixa concentração protéica ou limite na faixa de detecção do método.

Quantificações relativas entre as duas isoformas não foram feitas uma vez que não sabemos qual tipo de modificação protéica esta envolvida na sua presença. No caso de fosforilação infelizmente não foram adicionados inibidores de fosfatases durante a preparação dos extratos protéicos e qualquer medida da relação entre as isoformas poderia não representar a realidade biológica do sistema. Não resta dúvida que uma investigação mais detalhada da natureza bioquímica e da relevância biológica das isoformas de STI1 deverão ser rapidamente investigadas.

Assim demonstramos pela primeira vez que o ligante de PrPc, STI1, está presente tanto em plaquetas humanas como em micropartículas. Esforços adicionais estão sendo levados a cabo por outros membros do laboratório na tentativa de elucidar a função do PrPc em plaquetas bem como do seu ligante. Pelo que já foi descrito na literatura especulamos que o PrPc poderia funcionar na superfície da plaqueta como molécula de adesão, da mesma forma que as integrinas atuam neste contexto. Tal especulação não é desprovida de sentido uma vez que o PrPc pode funcionar como receptor de laminina (Graner et al., 2000a) e vitronectina (Hajj et al., submetido) e estar envolvido na adesão celular à laminina (Graner et al., 2000b) e a vitronectina (Hajj et al., submetido; Costa et al., em preparação)

Já a função de STI1 na plaqueta poderia estar envolvida com a modulação da atividade SOD, podendo ou não envolver o PrPc. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de STI1 estar atuando como co-chaperonina, estabilizando assim a

conformação de moléculas envolvidas com a manutenção da função plaquetária na homeostasia corpórea.

5. Conclusão

- . Presença de PrPc em plaquetas humanas.
- . Presença da proteína STI1 tanto em plaquetas humanas como em micropartículas.
- . Significado biológico continua uma questão a ser respondida.
- . Pareamento de expressão nos compartimentos plaquetários sugere a atuação coordenada na função plaquetária de manutenção de hemostasia corpórea.
- . A partir destes achados, pretende-se dar continuidade aos estudos sobre a relevância biológica destas duas moléculas no contexto das funções fisiológicas já estabelecidas para as plaquetas.

6. Referências bibliográficas

- AGUZZI, A. neuro-immune connection in spread of prions in the body? **Lancet**. 349:742-43, 1997.
- ANDERSON, R.G.W. Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. **Curr Opin Cell Biol**, v. 5, p. 647-652, 1993.
- BARRY, R.A.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell**. 46:417-428, 1986.
- BARRY, O.P.; PRATICO, D.; LAWSON, J.A.; FITZGERALD, G.A. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. **J. Clin. Invest.** v. 99, p. 2118-2127, 1997.
- BARRY, O.P.; FITZGERALD, G.A. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. **Thromb. Haemost.** v. 82, p. 794-800, 1999.
- BAJ-KRZYWORZEKA, M.; MAJKA, M.; PRATICO, D.; RATAJCZAK, J.; VILAIRE, G.; KIJOWSKI, J.; RECA, R.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, M.Z. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. **Exp. Hematol.** v. 30, p. 450-459, 2002.
- BERNAL-MIZRACHI, L.; JY, W.; JIMENEZ, J.J.; PASTOR, J.; MAURO, L.M.; HORSTMAN, L.L.; de MARCHENA, E.; AHN, Y.S. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndrome. **Am. Heart. J.** v. 145, p. 962-970, 2003.
- BECK, E.; DANIEL, P.M.; PARRY, H.B. Degeneration of the cerebellar and hypothalamo-neurohypophysial system in sheep with *scrapie*: its relationships to human system degenerations. **Brain**, v. 87, p. 153-176, 1964.
- BLATCH, G.L.; LÄSSELE, M.; ZETTER, B.R.; KUNDRA, V. Isolation of mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene**, v. 194, p. 277-282, 1997.
- BLÄTTLER, T.; BRANDNER, S.; RAEBER, A.J.; KLEIN, M.A.; VOLGTLÄNDER, A.; WEISSMANN, C.; AGUZZI, A. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. **Nature**. 389:69-73, 1997.
- BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. **Biochemistry**. 23:5898-5906, 1984.
- BOULANGER, C.M.; SCOAZEC, A.; EBRAHIMIAN, T.; HENRY, P.; MATHIEU, E.; TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. **Circulation**. 104, p. 2649-2652, 2001.
- BROWN, P. An epidemiologic critique of Creutzfeldt-Jakob disease. **Epidemiol Rev**, v. 2, p. 113-135, 1980.

- BROWN, D.R.; QIN, K.; HERMS, J.W.; MADLUNG, A.; MANSON, J.; STROME, R.; FRASER, P.E.; KRUCK, T.; BOHLEN, A. von; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; GIESE, A.; WESTAWAY, D.; KRETZSCHMAR, H. The cellular prion protein binds copper in vitro. **Nature**. 390:684-587, 1997.
- BROWN, D.R. Prion and prejudice:normal protein and synapse review. **Trends Neurosci**. 24:85, 2001.
- BRUCE, M. E. e FRASER, H. Amyloid plaques in the brain of mice infected with *scrapie*: morphological vaiation and staining properties. **Neuropathol Appl Neurol**, v. 1, p. 189-202, 1975.
- BRUCE, M.E.; MCCONNELL, i.; WILL, R.G.; IRONSIDE, J.W. Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. **Lancet**, 358:208-209, 2001.
- BRUNETTI, M.; MARTINELLI, N.; MANARINI, S.; MASCETRA, N.; MUSIANI, P.; CERLETTI, C.; AIELLO, F.B.; EVANGELISTA, V. Polymorphonuclear leukocyte apoptosis isinhibited by platelet released mediators. Role of TGF β . **Thromb. Haemost.** v. 84, p. 478-??, 2000.
- BÜELER, H.; FISHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H.P.; DeARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal dvelopment and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, v. 356, p. 577-582, 1992.
- BUSH, A.I.; TANZI, R.E. The molecular biology of A β deposition in Alzheimer disease. In: Dani, S.U., Hori, A. & Walter, G.I. (eds.) **Principles of Neuronal Aging**, p.103-113, 1997.
- CHIARINI, L.B.; FREITAS, A.R.O.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals, **EMBO J**, v.21, p.3317-3326, 2002.
- COLLINGE, J.; WHITTINGTON, M.A.; SIDLE, K.C.L.; SMITH, C.J.; PALMER, M.S.; CLARKE, A.R.; JEFFERYS, J.G.R. Prion protein is necessary for normal synaptic function. **Nature**. 370:295-297, 1994.
- COMBES, V.; SIMON, A.C.; GRAU, G.E.; ARNOUX, D.; CAMOIN, L.; SABATIER, F.; MUTIN, M.; SANMARCO, M.; SAMPOL, J.; DIGNAT-GEORGE, F. In vitro generation of endothelial microparticles and possivle prothrombotic activiy in patients with lupus anticoagulant. **J. Clin. Invest.** v. 104, p. 93-102, 1999.
- DIAMANT, M.; TUSHUIZEN, M.E.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? **Eur. J. Clin. Invest.** V.34, p.392-401, 2004.
- DIETRICH-MUSZALSKA A, OLAS B, RABE-JABLONSKA J. Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. **Platelets** 16:386-91, 2005.
- EDENHOFER, F.; RIEGER, R.; FAMULOK, M.; WENDLER, W.; WEISS, S.; WINNACKER, E.-L. Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of Hsp60 family. **J. Virol.** 70:4724-28, 1996.
- FORLOW, S.B.; McEVER, R.P; NOLLERT, M.U. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. **Blood** v. 95, p. 1317-1323, 2000.
- FOURCADE, O.; SIMON, M.F.; VIODE, C.; RUGANI, N.; LEBALLE, F.; RAGAB, A.; FOURNIE, B.; SARDA, L.; CHAP, H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. **Cell** v. 80, p. 919-927, 1995.

- GABRIEL, J.M.; OESCH, B.; KRETZSCHMAR, H.; SCOTT, M.; PRUSINER, S.B. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. **Proc Natl Acad Sci -USA**, v. 89, p. 9097-9101, 1992.
- GAJDUSEK, D.C. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. **Science**, v. 197, p. 943-960, 1977.
- GAO, B.; BIOSCA, J.; CRAIG, E. A.; GREENE, L.E.; EISENBERG, E. Uncoating of coated vesicles by yeast hsp70 proteins. **Journal Biol Chem**, v.76, p. 85-92, 2000.
- GASSET, M.; BALDWIN, M.A.; LLOYD, D.H.; GABRIEL, L.M.; OLTZMAN, F.C.; COHEN, F.; FLETTERICK, R.; PRUSINER, S.B. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. **Proc Natl Acad Sci- USA**, v. 89, p. 10940-10944, 1992.
- GEMMELL, C.H.; SEFTON, M.V.; YEO, E.L. Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. **J. Biol. Chem.** V. 268, p. 14586-14589, 1993.
- GILBERT, G.E.; SIMS, P.J.; WIEDMER, T.; FURIE, B.C.; SHATTIL, S.L. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. **J. Biol. Chem.** V. 266, p. 17261-17268, 1991.
- GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; ORESTES, V.F.; CABRAL, A.L.B.; VEIGA, S.S.; JULIANO, M.A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 76, p. 85-92, 2000a.
- GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; MARTINS, V.R.; JAY, D.G.; BRENTANI, R.R. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett**, v. 482, p. 257-260, 2000b.
- HARRISON, P.; BIGGERSTAFF, J.; YOUSSEFIAN, T.; CRAMER, E. Studies on the expression of prion protein (PrP^c) within human platelets. **Suppl.Thromb.Haemost.** 712, 1999.
- HEDGE, R.S.; MASTRIANNI, J.A.; SCOTT, M.R.; DeFEA, K.A.; TREMBLAY, P.; TORCHIA, M.; DeARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; LINGAPPA, V.R. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. **Science**, v. 279, p. 827-834, 1998.
- HOLME, P.A.; ORVIM, U.; HAMERS, M.J.; SOLUM, N.O.; BROSSTAD, F.R.; BARSTAD, R.M.; SAKARIESSEM, K.S. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** V. 17, p. 646-653, 1997.
- HONORÉ, B.; LEFFERS, H.; MADSEN, P.; RASMUSSEN, H.H.; VANDERKERCKHOVE, J.; CELIS, J.E. Molecular cloning and expression of a transmembrane-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **Journal Biol. Chem.**, v. 267, p. 8485-8491, 1992.

- HORNSHAW, M.P.; McDERMOTT, J.R.; CANDY, J.M.; LAKEY, J.H. Cooper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. **Biochem Biophys Res Commun.** 214:993-9, 1995.
- HUBER, J.; VALES, A.; MITULOVIC, G.; BLUMER, M.; SCHIMID, R.; WITZTUM, J.L.; BINDER, B.R.; LEITINGER, N. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 101-107, 2002.
- HUGEL, B.; SOCIE, G.; VU, T.; TOTI, F.; GLUCKMAN, E.; FREYSSINET, J.M.; SCROBOHACI, M.L. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. **Blood** v. 93, p. 3451-3456, 1999.
- HSIAO, K.K. From prion diseases to Alzheimer's disease. **J. Neural Transm [Suppl]** 49:135-144, 1997.
- JIANG, C.H.; TSIEN, J.Z.; SCHULTZ, P.G.; HU, Y. The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. **PNAS**, v. 98, p. 1930-4, 2000.
- JIN, M.; DRWAL, G.; BOURGEOIS, T.; STALTZ, J.; WU, H.M.. Distinct proteoma features of plasma microparticles. **Proteomics** v. 5, p., 2005.
- JONES, M.; HEAD, M.W.; CONNOLY, J.G.; FARQUHAR, C.F.; HORNSEY, V.S.; DUNCAN, S.P.; MACGREGOR, I.R. Purification of normal cellular prion protein from human platelets and the formation of a high molecular weight prion protein complex following platelet activation. **Biochem Biophys Res Comm.** 335, 48-56, 2005.
- JOOP, K.; BERCKMANS, R.J.; NIEUWLAND, R.; BERKHOUT, J. ROMIJN, F.P.; HACK, C.E.; STURK, A . Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. **Thromb. Haemost.**, v. 85, p. 810-820, 2001.
- KAKIZUKA, A. Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? **Trends Genet.** 14:396-402, 1998.
- KEYES, M.E. The prion challenge to the "central dogma" of molecular biology. **Stud Hist Phil Biol & Biomed Sci**, v. 30, p. 1-19, 1999.
- KOCISKO, D.A.; COME, K.H.; PRIOLA, S.A.; CHESEBRO, B.; RAYMOND, G.J.; LANSBURY, P.T.; CAUGHEY, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. **Nature.** 370:471-474, 1994.
- KRONE, P.H.; Heat shock proteins in development, aging and evolution. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 14, p. 249, 2003.
- KUWAHARA, C.; TAKEUCHI, A.M.; NISHIMURA, T.; HARAGUCHI, K.; KUBOSAKI, A.; MATSUMOTO, Y.; SAEKI, K.; MATSUMOTO Y.; YOKOYAMA, T.; ITOHARA, S.; ONODERA, T. Prions prevent neuronal cell-line death. **Nature.** 400:225-226, 1999.
- LASMÈZAS, C.I.; CESBRON, J.-Y.; DESLYS, J.-P.; DEMAÏMAY, R.; ADJOU, K.T.; RIOUX, R., LEMAIRE, C.; LOCHT, C.; DORMONT, D. Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. **J. Virol.** 70:1292-95, 1996.

- LEEuwENBERG, J.F.; SMEETS, E.F.; NEEFJES, J.J.; SHAFFER, M.A.; CINEK, T.; JEUNHOMME, T.M.; AHERN, T.J.; BUURMAN, W.A. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. **Immunology**, v. 77, p. 543-549, 1992.
- MACGREGOR, I.; HOPE, J.; BARNARD, G.; KIRBY, L.; DRUMMOND, D.; PEPPER, V.; HORNSEY, V.; BARCLAY, R.; BESSOS, H.; TURNER, M.; PROWSE, C. Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the components, **VoxSang.**, 77, 88-96, 1999.
- MALLAT, Z.; BENAMER, H.; HUGEL, B.; BENESSIANO, J.; STEG, P.G.; FREYSSINET, J.M.; TEDGUI, A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. **Circulation** v. 101, p. 841-843, 2000.
- MARTIN, S.; TESSE, A.; HUGEL, B.; MARTINEZ, C.; MOREL, O.; FREYSSINET, J.M.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. **Circulation** v. 109, p. 1653-1659, 2004.
- MANSON, J.; WEST, J.D.; THOMSON, V.; McBRIDE, P.; KAUFMAN, M.H.; HOPE, J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development**. 115: 117-122, 1992.
- MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M.; BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Med**, v. 3, p. 1376-1382, 1997.
- MARTINS, V.R.; MERCADANTE, A.F.; CABRAL, A.L.; FREITAS, A.R.; CASTRO, R.M. insights into the physiological function of cellular prion protein. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 5, p. 585-595, 2001.
- MARTINS, V.R. e BRENTANI, R.R. The biology of the cellular prion protein. **Neurochem Int**, v. 41, n. 5, p. 353-355, 2002.
- MARTINS, V.R.; LINDEN, R.; PRADO, M.A.M.; WALZ, R.; SAKAMOTO, A.C.; IZQUIERDO, I.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein: on road for functions. **FEBS Lett**, v. 512, p.25-28, 2002.
- MASTERS, C.; GAJDUSEK, D.C.; GIBBS JUNIOR, C.J. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolation from the Gerstmann-Sträussler Syndrome. **Brain**, v. 104, p. 559-588, 1981.
- McKINLEY, M.P.; BOLTON, D.C.; PRUSINER, S.B. A protease-resistant protein in structural component of the *scrapie* prion. **Cell**, v. 35, p. 57-62, 1983.
- MEYER, R. K.; McKINLEY, M.P.; BOWMAN, K.A. Separation and properties of cellular and *scrapie* prion proteins. **Proc Natl Acad Sci - USA**, v. 83, p. 2310-2314, 1986.
- MIYAZAKI, Y.; NOMURA, S.; MIYAKE, T.; KAGAWA, H.; KITADA, C.; TANIGUCHI, H.; KOMIYAMA, Y.; FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; FUKUHARA, S. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. **Blood** v. 88, p. 3456-3464, 1996.
- MIYOSHI, H.; UMESHITA, K.; SAKON, M.; IMAJOH-OHMI, S.; FUJITANI, K.; GOTOH, M.; OIKI, F.; KAMBAYASHI, J.; MONDEN, M. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. **Gastroenterology**, v. 110, p. 1897-1904, 1996.

- MOREL, O.; TOTI, F.; HUGEL, B; FREYSSINET, J.M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. **Curr. Opin. Hematol.** v. 11, p. 156-164, 2004.
- NICOLET, C.M.; CRAIG, E.A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v.9, p. 3638-3646.
- NIEUWLAND, R.; BERKMANS, J.R.; MCGREGOR, S.; BÖING, A.N.; ROMIJN, F.P.H.Th.M.; WESTENDORP, R.G.D. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. **Blood** v. 95, p. 930-935, 2000.
- NGUYEN, J.; BALDWIN, M.A.; COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B. Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformation transitions. **Biochemistry.** 34:4186-92, 1995.
- NOMURA, S.; YANABU, M.; KIDO, H.; FUKUROI, T.; YAMAGUCHI, K.; SOGA, T.; NAGATA, H.; KOKAWA, T.; YASUNAGA, K. Antiplatelet autoantibody-related microparticles in patients with idiopathic (autoimmune) thrombocytopenic purpura. **Ann. Hematol.** v. 62, p. 103-107, 1991.
- NOMURA, S.; KOMIYAMA, Y.; MIYAKE, T.; MIYASAKI, Y.; KIDO, H.; SUZUKI, M.; KAGAWA, H.; YANABU, M.; TAKAHASHI, H.; FUKUHARA, S. Amyloid beta-protein precursor-rich platelet microparticles in thrombotic disease. **Thromb. Haemost.** , v. 72, p. 519-522, 1994.
- NOMURA, S.; IMAMURA, A.; OKUNO, M.; KAMIYAMA, Y.; FUJIMURA, Y.; YKEDA, Y.; FUKUHARA, S. Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans. Enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines. **Thromb. Res.**, v. 98, p. 257-268, 2000.
- NOMURA, S.; SUZUKI, M.; KATSURA, K.; XIE, G.L.; MIYAZAKI, Y.; MIYAKE, T.; KIDO, H.; KAGAWA, H.; FUKUHARA, S. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 116, p. 235-240, 1995.
- OESCH, B.; WESTAWAY, D.; WÄLCHLI, M. A cellular gene encodes *scrapie* PrP 27-30 protein. **Cell**, v. 40, p. 735-746, 1985.
- OGURA, H.; KAWASAKI, T.; TANAKA, H.; KOH, T.; TANAKA, R.; OZEKI, Y.; HOSOTSUBO, H.; KUWAGATA, Y.; SHIMAZU, T.; SUGIMOTO, H. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. **J. Trauma** v. 50, p. 801-809, 2001.
- OKAMOTO, I. H. Encefalopatia Espongiforme Sub-aguda: Demências priônicas. **Ver. NeuroCienc.**, v.12, 2004.
- OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; SALUK-JUSZCZAK, J.; ZIELINSKI, T. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. **Thromb. Res.** v. 107, p. 141-145, 2002.
- PAN, K.M.; STAHL, N.; PRUSINER, S.B. Purification and properties of cellular prion protein from Syrian hamster brain. **Protein Sci**, v. 1, p. 1343-1352, 1992.
- PATEL, K.D.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MCINTYRE, T. M. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. **J. Biol. Chem.**, v. 267- p. 15168-15175, 1992.

- PRIOLA SA, CAUGHEY B, WEHRLY K, CHESEBRO B. A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. **J Biol Chem.** 270:3299-305, 1995.
- PRUSINER, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science.** 216:136-144, 1982.
- PERINI, F.; VIDAL, R.; GHETTI, B.; TAGLIAVINI, F.; FRANGIONE, B.; PRELLI, F. PrP²⁷⁻³⁰ is a normal soluble prion protein fragment released by human platelets. **Biochem.Biophys.res.Commun.** 223, 572-577, 1996.
- PRUSINER, S.B.; GAJDUSEK, D.C.; ALPERS, M.P. Kuru with incubation periods exceeding two decades. **Ann Neurol**, v. 12, p. 1-9, 1982.
- PRUSINER, S.B.; MCKIMLEY, M.P.; BOWMAN, K.A.; BOLTON, D.C.; BENDHEIN, P.E.; GROTH, D.F.; GLENER, G.G. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. **Cell.** 35: 349-358, 1983.
- PRUSINER, S.B. Molecular biology of prion disease. **Science**, v. 252, p. 1515-1522, 1991.
- PRUSINER, S.B. Genetic and infectious prion diseases. **Arch Neurol**, v. 50, p.1129-1153, 1993.
- PRUSINER, S.B. Prions. **Proc Natl Acad Sci- USA**, v.95, p. 13363-13383, 1997.
- PRUSINER, S.B.; SCOTT, M. R.; DeARMOND, S.J.; COHEN, F.E. Prion protein biology. **Cell**, v. 93, p. 337-348, 1998.
- RIEGER, R.; EDENHOFER, F.; LASMÉZAS, C.I.; WEISS, S. The human 37kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cell. **Nature Medicine.** 3:1383-88, 1997.
- ROESLER, R.; WALZ, R.; QUEVEDO, J.; DE PARIS, F.; ZANATA, S.M.; GRANER, E.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid PrP^c. **Mol. Brain Res.** 71:349-53, 1999.
- ROGERS, M.; TARABOULOS, A.; SCOTT, M.; GROTH, D.; PRUSINER, S.B. Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites. **Glycobiology**, v. 1, p. 101-109, 1990.
- ROOS, R.; GAJDUSEK, D.C.; GIBBS Jr., C.J. The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. **Brain**, v. 96, p. 1-20, 1973.
- SAKAGUSHI, S.; KATAMINE, S.; NISHIDA, N.; MORIUCHI, R.; SHIGEMATSU, K.; SUGIMOTO, T.; NAKATANI, A.; KATAOKA, Y.; HOUTANI, T.; SHIRABE, S.; OKADA, H.; HASAGAWA, S.; MIYAMOTO, T.; NODA, T. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. **Nature.** 380:528-531, 1996.
- SATTA, N.; TOTI, F.; FEUGEAS, O.; BOHBOT, A.; DACHARY-PRINGENT, J.; ESCHWEGE, V.; HEDMAN, H.; FREYSSNET, J.M. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. **J. Immunol.** v. 153, p. 3245-3255, 1994.

- SCHECTER, A.D.; SPIRN, B.; ROSSIKHINA, M.; GIESEN, P.L.A.; BORDANOV, W.; FALLON, J.T.; FISHER, E.A.; SCHNAPP, L.M.; NEMERSON, Y.; TAUBMAN, M. B. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 87, p. 126-132, 2000.
- SHMERLING, D.; HEGYI, I.; FISHER, M.; BLÄTTLER, T.; BRANDNER, S.; GÖTZ, J.; RÜLINCKE, T.; FLECHSIG, E.; COZZIO, A.; MERING, C.; HANGARTNER, C.; AGUZZI, A.; WEISSMANN, C. Expression of amino-terminally truncated PrP in mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. **Cell**, v. 93, p. 203-214, 1998.
- SHYNG, S.-L.; HEUSER, J.E.; HARRIS, D.A. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. **J Cell Biol**, v. 125, p. 1239-1250, 1994.
- SHYNG, S.-L.; MOULDER, K.J.; LAESKO, A.; HARRIS, D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. **J Biol Chem**, v. 270, p. 14793-14800, 1995.
- SILJANDER, P.; CARPEN, O.; LASSILA, R. Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis. **Blood** v. 87, p. 4651-4663, 1996.
- SIMS, P.J.; FAIONI, E.M.; WIEDMER, T.; SHATTIL, S.J. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. **J. Biol. Chem.** v. 263, p. 18205-18212, 1988.
- SIMS, P.J.; WIEDMER, T.; ESMON, C.T.; WEISS, H.J.; SHATTIL, S.J. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 17049-17057, 1989.
- STARKE, R.; HARRISON, P.; MACKIE, I.; WANG, G.; ERUSALIMSKY, J.D.; GALE, R.; MASÉ, J.-M.; C RAMER, E.; PIZZEY, A.; BIGGERSTAFF, J.; MACHIN, S. The expression of prion protein (PrP_C) in the megakaryocyte lineage. **J Thrombosis and Haemos**, 3: 1266-1273, 2005.
- SMITH, D.F.; SULLIVAN, W.P.; MARION, T.N.; ZAITSU, K.; MADDEN, B.; McCORNICK, D.J.; TOFT, D.O. Identification of a 60 kDa stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. **Mol. Cell. Biol.**, v.13, p. 869-876, 1993.
- TANS, G.; ROSING, J.; THOMASSEN, M.C.; HEEB, M.J.; ZWAAL, R.F.; GRIFFIN, J.H. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. **Blood**, v.77, p.2641-2648, 1991.
- TARABOULOS, A.; RAEHER, A.J.; BOERCHELT, D.R.; SERBAN, D.; PRUSINER, S.B. Synthesis and trafficking of prion proteins in culture cells. **Mol Biol Cell**, v. 3, p. 851-863, 1992.
- TATE, D.A. Platelet activation detected by platelet-derived microparticles in coronary sinus blood from patients with unstable coronary syndromes. **Circulation**, v. 86, p. 3193A, 1992.

- VAN DER SPUIY, J. ; KANA, B.D.; DIRR, H.W.; BLATCH, G. L Heat Shock protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. **Biochem. J.**, v. 345, p. 645-651, 2000.
- VAN DER SPUIY, J. ; KANA, B.D.; DIRR, H.W.; BLATCH, G. L The chaperone murine stress-inducible protein 1: overexpression, purification, and characterization. **Protein Expression and Purification**, v.21, p. 462-469, 2001.
- VEY, M.; PILKUHN, S.; WILLE, H.; NIXON, R.; DeARMOND, S.J.; SMART, E.J.; ANDERSON, R.G.W.; TARABOULOS, A.; PRUSINER, S.B. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proc Natl Acad Sci - USA**, v. 93, p. 14945-14949, 1996.
- VILES, J.H.; COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B.; GOODIN, D.B.; WRIGHT, P.E.; DYSON, H.J. Cooper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. **Proc.Natl.Acad.Sci. USA** 96:2042-47, 1999.
- WALZ R.; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I.C.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I.; CAVALHEIRO, E.A.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia**. 40:1679-82, 1999.
- YEHIELY, F.; BAMBOROUGH, P.; DA COSTA, M.; PERRY, B.J.; THINAKARAM, G.; COHEN, F.E.; CARLSON, G.A.; PRUSINER, S.B. identification of candidate proteins binding to prion proteins. **Neurobiology of Disease**. 3:339-355, 1997.
- ZANATA, S.M.; LOPES, R.; MERCADANTE, A.F.; HAJJ, G.; FREITAS, A.R.O.; CHIARINI, L.B.; CABRAL, A.L.B.; NOMIZO, R.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; JACHIERI, S.G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R. The stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **EMBO J**, v.21, p. 3307-3316, 2002a.
- ZANATA, S.M.; HOVATTA, I.; ROHM, B.; PUSHEL, A.W. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A induced cytoskeletal collapse. **J Neurosci**, v. 22, p. 471-477, 2002b.
- ZWAAL, R.F.; SCHROIT, A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipids asymmetry in blood cells. **Blood**, v. 89, p. 1121-1132, 1997.